ORSAY
Série A, N°
N° D'ordre : 1093

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS XI

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Jacqueline BERGMAN née SIVIRINE

Maître assistant

Sujet de la Thèse :

Analyse expérimentale et interprétation de l'hyperpolarisation post-tétanique du nerf sciatique de grenouille.

SOUTENUE LE 19 MARS 1973, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. BENOIT — PRÉSIDENT

M. ASCHER
M. CORABŒUF
M. SCHMIDT — EXAMINATEURS

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS XI

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Jacqueline BERGMAN

Maitre assistant

Sujet de la Thèse :

Analyse expérimentale et interprétation de l'hyperpolarisation post-tétanique du nerf sciatique de grenouille.

SOUTENUE LE 19 MARS 1973, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. BENOIT — PRÉSIDENT

M. ASCHER
M. CORABŒUF
M. SCHMIDT
— EXAMINATEURS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

S O M M A I R E

INTRODUCTION I

CHAPITRE I - TRANSPORTS ACTIFS DE SODIUM ET POTASSIUM DANS LES CELLULES EXCITABLES. 1

1°/ Nécessité et caractères du transport actif. 9

2°/ Mécanisme du transport. 9

3°/ Variations du potentiel de membrane induites par l'activation de la pompe Na-K. 14

CHAPITRE II - ANALYSE CRITIQUE DE CERTAINES DONNEES DE LA LITTERATURE ET OBJECTIFS EXPERIMENTAUX. 24

CHAPITRE III - ETUDE DE LA PREPARATION DU NERF SCIATIQUE DE GRENOUILLE ET METHODES EXPERIMENTALES. 31

Description macroscopique de la préparation. 33

Etude microscopique du nerf sciatique. 33

Mesure du potentiel de membrane.

Signification des mesures obtenues par la technique du double espace saccharose. 42

Stimulation effective du contingent myélinisé. 47

Dispositif expérimental. 50

Limites de la technique. 55

Préparation des solutions. 56

CHAPITRE IV - ANALYSE EXPERIMENTALE ET RESULTATS. 59

I - VARIATIONS D'AMPLITUDE DE L'HPT EN FONCTION DES PARAMETRES DE STIMULATION. 63

I.1- L'amplitude de l'HPT dépend de la durée du tétanos conditionnant. 63

I.2 - L'amplitude de l'HPT dépend de la fréquence de stimulation. 65

I.3 - Variation d'amplitude de l'HPT à fréquence et durée de stimulation tétanique variables. 67

II - LA CAUSE PRIMAIRE DE L'HPT EST L'ACCUMULATION D'IONS Na^+ DANS L'AXOPLASME DES FIBRES MYELINISES. 73

II.1 - L'amplitude de l'HPT dépend du nombre de fibres myélinisées excitées pendant le tétanos conditionnant. 73

II.2 - Tétrodotoxine et amplitude de l'HPT. 77

II.3 - Variation d'amplitude de l'HPT avec la concentration en sodium dans le milieu extra-cellulaire. 82

III - L'HPT EST ABOLIE PAR LES INHIBITEURS DU TRANSPORT ACTIF DE SODIUM ET POTASSIUM. 87

III.1 - La suppression des ions K^+ du Ringer n'a aucun effet sur l'HPT. 87

III.2 - L'amplitude de l'HPT croît avec le refroidissement de la préparation. 88

III.3 - L'HPT est abolie dans le Ringer lithium. 91

III.4 - Le 2-4 dinitrophénol abolit l'HPT du nerf sciatique. 97

III.5 - L'HPT est abolie par l'ouabaïne. 97.

IV - ANALYSE DU DECOURS TEMPOREL DE L'HPT. 100

IV.1 - La durée de l'HPT croît avec la durée du tétanos. 101

IV.2 - Le décours temporel de l'HPT se décompose en deux exponentielles de constantes de temps différentes. 105

IV.3 - T_1 est pratiquement indépendant de la durée du tétanos alors que T_2 augmente avec la durée de la stimulation. 107

IV.4 - Le décours temporel de l'HPT n'est plus exponentiel à basse température. 109

IV.5 - Les poisons agissent différemment sur les constantes de temps de l'HPT. 111

Interprétation des deux constantes de temps. 115

V - L'AMPLITUDE DE L'HPT DEPEND DE LA PERMEABILITE AU POTASSIUM DE LA MEMBRANE PASSIVE. 122

V.1 - L'HPT du nerf sciatique est insensible à la substitution d'anions non perméants aux ions chlorure du Ringer. 123

V.2 - L'HPT est abolie par le tétra-éthylammonium 125

V.3 - La résistance de membrane augmente pendant l'HPT. 128

V.4 - L'HPT abolie par le TEA n'est pas restaurée par l'accroissement de $[K]_e$. 132

V.5 - La durée du potentiel d'action augmente avant que ne diminue l'HPT pendant l'application de TEA. 134

V.6 - L'amplitude de l'HPT diminue dans le Ringer enrichi en potassium. 141

V.7 - L'amplitude de l'HPT dépend du potentiel de membrane. 144

V.8 - Une dépolarisation prolongée appliquée pendant la phase lente restaure la phase rapide. 155

VI.1 - Effets de la variation de l'espace extra-cellulaire sur l'HPT. 163

CHAPITRE V - CONCLUSIONS GENERALES. 167

BIBLIOGRAPHIE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548016_0021

I N T R O D U C T I O N

L'hyperpolarisation post-tétanique est une variation transitoire de la polarisation membranaire qui survient à la fin d'une période d'excitation rythmique et plus ou moins durable appelée "tétanos". Elle peut être observée sur des types de membranes excitables très différents et consiste en une élévation temporaire (hyperpolarisation) du potentiel de membrane au dessus de sa valeur normale de repos. Elle atteint son amplitude maximale dès la fin du tétanos puis décroît progressivement et disparaît. L'hyperpolarisation post-tétanique est habituellement un phénomène de faible amplitude et de grande constante de temps.

Malgré son décours stéréotypé et un antécédent causal constant (le tétanos), l'hyperpolarisation post-tétanique peut, selon le type cellulaire considéré, avoir des origines fondamentalement différentes.

Ainsi, certaines hyperpolarisations post-tétaniques peuvent résulter d'une augmentation progressive de la perméabilité au potassium de la membrane passive (P_K) ou, plus généralement encore, d'un accroissement du rapport P_K / P_{Na}.

Dans d'autres cas, l'hyperpolarisation post-tétanique résulte de l'activation du système transporteur actif ("pompe au sodium et potassium") par l'entrée de sodium dans la cellule au cours de l'excitation tétanique. Ce système transporteur, en effet, excrète le sodium entré passivement dans la cellule et absorbe le potassium perdu dans l'espace extra-cellulaire. La vitesse d'expulsion du sodium étant généralement supérieure à la vitesse d'absorption du potassium, un flux net sortant de charges positives ("courant de pompe") traverse la membrane et crée une surpolarisation qui confère au système transporteur un caractère "électrogène".

Dans certains cas, le caractère électrogène de la pompe est masqué (ou la pompe n'est pas électrogène) par une basse résistance de la membrane passive. L'activité de la pompe

est néanmoins décelable si l'arrangement spatial des cellules, ou d'autres raisons d'ordre morphologique, font que l'espace extra-cellulaire est localement réduit. Dans ce cas, l'activation de la pompe peut aboutir à un abaissement de la concentration en potassium au voisinage de la face externe de la membrane excitable et créer un accroissement du potentiel d'équilibre des ions potassium. Il s'en suit une hyperpolarisation transitoire de la membrane qui est le reflet indirect de l'activité de la pompe.

On pourrait ajouter encore que l'excitation réitérée à cadence élevée peut accroître notablement la concentration intra-cellulaire (et éventuellement réduire la concentration extra-cellulaire locale) en ions Na^+. Si la membrane est perméable au sodium à la fin du tétanos, la réduction du potentiel d'équilibre des ions Na^+ peut aboutir, elle aussi, à une hyperpolarisation.

On notera enfin, que ces différents facteurs, responsables éventuels de la génération d'une hyperpolarisation post-tétanique, ne s'excluent pas mutuellement. Il en résulte que l'analyse du phénomène global et son interprétation sont complexes et en général peu aisées. On peut dire d'ailleurs que le critère absolu permettant d'affirmer que tel ou tel autre mécanisme est en cause n'existe pas réellement.

Notre travail a consisté à analyser l'hyperpolarisation post-tétanique du nerf sciatique de Grenouille.

Ce tronc nerveux est habituellement considéré comme un nerf "myélinisé" et est utilisé en tant que tel comme préparation expérimentale. Nous démontrerons, sur la base d'un comptage histologique, que cette conception est fausse en toute rigueur mais que le nerf, pour l' électrophysiologiste, peut être effectivement considéré comme un faisceau de fibres myélinisées moyennant certaines réserves.

L'analyse de l'hyperpolarisation post-tétanique du nerf sciatique était d'autant plus intéressante que le phénomène n'apparaît pas sur un axone myélinisé isolé. En outre, notre

espoir était que cette hyperpolarisation représente, d'une façon ou d'une autre, l'activité du système transporteur Na-K très insuffisamment étudié sur ce type d'axone.

Nous avons pu démontrer que l'hyperpolarisation post-tétanique reflète effectivement l'activité d'une pompe Na-K via la variation du potentiel d'équilibre des ions potassium décelée par la membrane passive. Nous avons démontré aussi qu'il s'agit de la pompe des fibres myélinisées et nous concluons que celle-ci est susceptible d'assurer non seulement la constance du milieu intra-cellulaire mais aussi celle du milieu extra-cellulaire séparé du milieu intérieur par la barrière de diffusion qu'est le périnèvre.

Compte-tenu de ces conclusions, la partie bibliographique du mémoire, (chapitre I) porte essentiellement sur les transports actifs de sodium et potassium dans les cellules excitables.

Le chapitre II sera consacré à une brève discussion des données de la littérature concernant ce type de transport dans les fibres myélinisées. Nous démontrerons que les quelques travaux qui ont été consacrés à cette étude sont, dans le contexte actuel, très criticables et par conséquent, peu convaincants.

Le chapitre III a pour objet de décrire la préparation et les techniques expérimentales que nous avons utilisées. Nous apporterons dans cette partie du mémoire nos premiers résultats portant sur le comptage des axones dans le tronc nerveux mixte.

Les résultats expérimentaux, leur interprétation et leur discussion feront l'objet du chapitre IV.

Le dernier chapitre (chapitre V) sera consacré aux conclusions générales. Nous les déduirons d'une récapitulation des résultats essentiels présentée sous forme de tableaux synthétiques. Quelques pages seront consacrées à l'analyse des conséquences fonctionnelles qu'impliquent nos conclusions.

-:-:-:-:-:-

C H A P I T R E I

TRANSPORTS ACTIFS DE SODIUM ET POTASSIUM DANS LES CELLULES EXCITABLES.

1° - Nécessité et caractères du transport actif.

Une cellule excitable est comparable à un système à deux compartiments séparés par une membrane inégalement perméable aux ions contenus en solution dans chacun de ces compartiments.

L'analyse du compartiment intra-cellulaire révèle une concentration en potassium quarante à cinquante fois plus élevée dans la cellule que dans le milieu extra-cellulaire. La concentration en ions sodium et chlorure, en revanche, apparaît en général dix à vingt fois plus faible dans le milieu intra-cellulaire que dans le compartiment extra-cellulaire.

L'inégalité de ces distributions ioniques, associée à une perméabilité sélective (mais non exclusive) de la membrane pour certains ions, crée entre les deux faces de celle-ci, une différence de potentiel appelée potentiel de membrane. Cette d.d.p. (Em) est en fait la force électromotrice d'une pile de diffusion complexe. La valeur de Em en effet, dépend des perméabilités relatives de la membrane aux différentes espèces ioniques et du potentiel d'équilibre thermodynamique de chacune de ces dernières.

Si l'on admet que les flux ioniques spécifiques traversent la membrane sont indépendants les uns des autres, si la membrane peut être considérée comme homogène et si le champ électrique dans son épaisseur est constant, la valeur de Em, atteinte lorsque la somme algébrique des courants ioniques nets est nulle, est (HODGKIN-KATZ,1949) :

$$Em = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_e + a[Na]_e + b[Cl]_i}{[K]_i + a[Na]_i + b[Cl]_e}$$

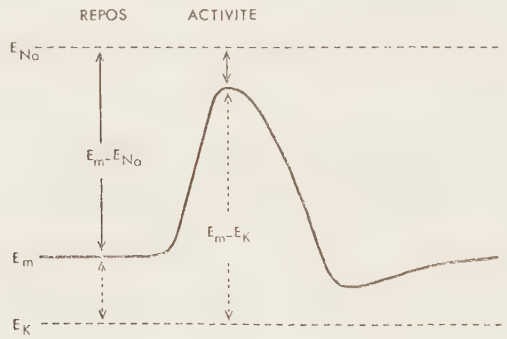
où : $a = P_{Na} / P_K$

$b = P_{Cl} / P_K$

$[K]_e$ et $[K]_i$; $[Na]_e$ et $[Na]_i$; $[Cl]_e$ et $[Cl]_i$ sont les activités des ions potassium, sodium et chlore dans les compartiments extra et intra-cellulaires respectivement.

P_K , P_{Na} , P_{Cl} sont les coefficients de perméabilité de la membrane au potassium, au sodium et au chlore.

La valeur de Em, au repos, est telle que le potentiel de la face interne de la membrane est plus négatif de 80 mV environ que celui de la face externe. Une telle polarisation tend à attirer passivement les cations du compartiment extra-cellulaire vers le milieu intra-cellulaire. Cette attraction est très forte pour les ions Na^+ dont le potentiel d'équilibre thermodynamique (E_{Na}) est voisin de +50 mV. En fait, l'entrée passive de sodium reste faible au repos, malgré une différence de potentiel de l'ordre de 130 mV entre le potentiel de membrane (Em) et le potentiel d'équilibre du sodium. La raison est que la perméabilité membranaire est faible pour les ions Na^+ au repos.



Lors de la mise en activité, par contre, P_{Na} augmente brusquement et l'entrée d'ions sodium est massive bien que la dépolarisation membranaire tende à réduire la d.d.p. $Em - E_{Na}$.

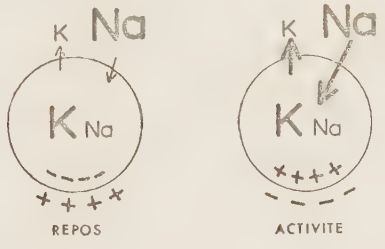
En ce qui concerne le potassium, le calcul du potentiel d'équilibre (E_K) sur la base de l'équation de NERNST indique une valeur de l'ordre de -90 à -95 mV, voisine de la valeur du potentiel de repos. Ceci signifie que la fuite de potassium au repos est faible bien que la membrane soit assez fortement perméable

à l'ion K^+.

Lors de l'excitation, la dépolarisation de la membrane a deux effets : - elle augmente la d.d.p. $Em - E_K$
- elle accroît P_K (ce qui, en retour, tend à repolariser la membrane vers le niveau de E_K).

Ces deux facteurs contribuent en définitive à augmenter fortement la fuite de potassium du compartiment intra-cellulaire vers le milieu extérieur.

Si, par simplification, on admet que les ions chlorure se distribuent de part et d'autre de la membrane en accord avec la valeur de Em (ce qui signifie en pratique que le potentiel d'équilibre des ions Cl^- est égal au potentiel de repos) on peut conclure que le compartiment intra-cellulaire tend en permanence, mais pendant l'activité surtout, à gagner des ions Na^+ et à perdre des ions K^+.



En résumé, une cellule excitable dont la membrane est perméable à plusieurs espèces ioniques dont les potentiels d'équilibre sontdifférents ne peut être en équilibre thermodynamique. Par conséquent, en l'absence d'un système de transport convenable, les concentrations ioniques du compartiment intra-cellulaire devraient égaler, à plus ou moins long terme, celles du compartiment extra-cellulaire.

Néanmoins, les concentrations en électrolytes cellulaires restent remarquablement constantes pendant toute l'existence de la cellule. Autrement dit, la cellule reste dans un état stable. Une telle situation n'est concevable que si un système de transport ionique compense très exactement, à long terme du moins, les pertes et les gains passifs du compartiment

intra-cellulaire. Ce transport, qui s'effectue nécessairement contre les gradients électro-chimiques, requiert obligatoirement un apport d'énergie. Il est appelé pour cette raison "transport actif" (USSING, 1949) et peut être assimilé pour le sodium, à une excrétion, pour le potassium, à une absorption.

L'énergie nécessaire à l'accomplissement de ce transport actif provient du métabolisme cellulaire comme l'avaient soupçonné GERARD (1932) et d'autres à sa suite parmi lesquels on retiendra LORENTE DE NO (1947) et WRIGHT (1947). Ces trois auteurs, indépendamment les uns des autres, avaient pu montrer que l'anoxie causait une diminution marquée du potentiel de lésion des nerfs périphériques de Batraciens ou de Mammifères.

Si à cette époque on percevait la nécessité d'une intervention du métabolisme dans le maintien des constantes cellulaires, les rapports entre le métabolisme et le système transporteur restaient très obscurs ou très souvent confondus en une seule et même entité. Ainsi, pour LORENTE DE NO, le "métabolisme" était "le principal facteur" déterminant le potentiel de repos de la cellule nerveuse, le gradient d'ions potassium ne jouant qu'un rôle secondaire.

A partir de 1949, le concept de transport actif tendait à s'imposer en ce qui concernait au moins certaines fonctions cellulaires (absorptions et sécrétions). REHM (1949) par exemple, formulait une théorie de la sécrétion d'acide par les cellules de la muqueuse gastrique dans laquelle était impliqué un transport d'ions Cl^- vers la lumière de l'estomac. A la même époque, USSING proposait qu'une "pompe électrogène" rende compte du transport actif de sodium observé à travers la peau de Grenouille; la réabsorption de potassium devait être " probablement de nature électrostatique" et, cependant, "peut-être le résultat de l'extrusion active de sodium".

L'éventualité d'un couplage entre un transport actif et un autre transport de nature indéterminée était pour la première fois évoquée.

Deux ans plus tard, HODGKIN (1951), après avoir formulé

dans ses grandes lignes la théorie moderne de l'excitation nerveuse, concluait à la nécessité d'un transport actif capable d'expulser le sodium entré dans le compartiment intra-cellulaire et de réabsorber le potassium perdu par ce même compartiment. HODGKIN, discutant les modalités de ce transport actif, envisageait que la pompe métabolique puisse avoir ou non un caractère "électrogénique" :

> " D'une part, on pourrait supposer que le métabolisme crée un courant sodium en éjectant les ions Na^+ tels quels ... ce courant sortant cesserait si la pompe au sodium pouvait soudain être éliminée par un inhibiteur métabolique approprié.... Dans un système de cette sorte, l'extrusion du sodium pourrait temporairement élever le potentiel de repos au dessus de sa valeur normale .....
>
> D'autre part, on peut imaginer que la pompe au sodium n'aît pas d'effet immédiat sur le potentiel de membrane. Ceci arriverait si le sodium quittait la cellule en combinaison avec un anion, ou si l'expulsion de sodium était couplée dans le rapport 1/1 avec l'entrée d'ions H^+ ou K^+. Lorsque cette pompe serait éliminée, il n'y aurait aucune chute brutale du potentiel de membrane. $[Na]_i$ augmenterait lentement et la concentration en potassium diminuerait de même ce qui s'accompagnerait d'une chute graduelle du potentiel de repos.... "

Dès lors était proposée l'alternative suivante : - le système transporteur peut être <u>électrogène</u> (si son activité correspond à un transport net de charges à travers la membrane) ou électroneutre si le transport net de charges est nul. Dans le premier cas, la pompe est en principe créatrice d'un courant qui s'ajoute à celui que l'on peut prévoir des flux diffusionnels passifs. Dans le second cas, le potentiel de membrane ne dépend pas, directement du moins, d'un transport actif. HODGKIN prévoit que le caractère électrogène éventuel de la pompe doit s'exprimer par une surpolarisation (hyperpolarisation) de la membrane.

Dès 1952, LUNDBERG et OSCARSON publiaient des expériences qui, à l'époque en tous cas, pouvaient être considérées comme favorables à une pompe électrogène. Etudiant en effet l'"overshoot post-anoxique" du potentiel de démarcation de racines spinales du Chat, (l'overshoot en question est une surpolarisation transitoire de la membrane survenant lors du retour

en phase aérobie après une anoxie durable), ces auteurs montrent que l'overshoot n'apparaît pas si le milieu de survie ne contient pas de sodium.

Dans les années suivantes HODGKIN et KEYNES (1955), mesurent par la technique des traceurs radioactifs l'efflux de sodium et l'influx de potassium à travers la membrane de l'axone géant de Calmar. Ces auteurs font alors 4 observations fondamentales qui ont valeur de démonstration :

a/ - l'efflux de Na est réduit par des poisons du métabolisme cellulaire (cyanure, 2-4 dinitrophénol, azide de sodium) et par l'abaissement de température.

b/ - l'efflux de Na dépend de la concentration extra-cellulaire en potassium. Il est fortement réduit si $[K]_e$ est nul.

c/ - l'influx de potassium est en grande partie supprimé par les agent qui inhibent l'efflux de Na.

d/ - l'inhibition de la pompe ne produit aucun effet sur le potentiel de repos.

Ainsi était-il démontré que des flux unidirectionnels, d'intensité supérieure à celle que prévoient les lois de la diffusion, sont abolis par des inhibiteurs du métabolisme. Ces flux sont donc l'expression d'un transport actif, ils sont couplés l'un à l'autre. Leur abolition est sans effet immédiat sur le potentiel de membrane. Il semblait, en outre, que la pompe métabolique au sodium et au potassium n'était pas électrogène. HODGKIN et KEYNES notaient néanmoins que la basse résistance de membrane de leur préparation pouvait shunter la force électromotrice d'une pompe électrogène et ainsi, la masquer.

Les mêmes auteurs, l'année suivante, après avoir montré que l'efflux de sodium était activé par l'accroissement de la concentration intra-cellulaire en sodium, notaient qu'une injection d'ions Na^+ dans le compartiment intra-cellulaire provoquait, dans la plupart des cas, une faible augmentation du potentiel de repos. Bien que cette observation fut favorable

à l'idée selon laquelle la pompe Na-K était électrogène, HODGKIN et KEYNES hésitaient à accepter cette possibilité sur la seule base de ces expériences.

Une année plus tard, une observation fondamentale était faite par POST et JOLLY (1957) sur des hématies dont le milieu interne avait été enrichi en sodium radioactif et appauvri en potassium par une incubation prolongée à basse température. Dans ces conditions expérimentales, les concentrations en sodium et potassium intra-cellulaires devenaient égales aux concentrations extra-cellulaires. Le retour à température normale dans un milieu contenant du sodium non radioactif et du potassium radioactif permettait de mesurer facilement l'efflux actif de sodium et l'influx actif de potassium. POST et JOLLY constataient alors que l'influx de potassium était proportionnel à l'efflux de sodium, le coefficient de proportionnalité étant de 2/3. Cette expérience démontrait, sur une autre préparation, l'existence de transports actifs couplés. Elle prouvait que le couplage n'excluait pas la possibilité que la pompe soit électrogène.

La même année, CALDWELL et KEYNES (1957) montraient que l'injection d'ATP dans l'axone géant de Calmar empoisonné par du cyanure restaurait momentanément l'efflux actif de sodium. Cette expérience capitale suggérait que les composés phosphatés riches en énergie participaient directement au transport ionique actif.

Trois ans plus tard, CALDWELL, HODGKIN, KEYNES et SHAW (1960) répétaient cette expérience et montraient que l'injection d'adenosinetriphosphate (ATP) dans l'axone empoisonné produisait un "extra-efflux" de sodium environ 2,5 fois plus élevé que l'"extra-influx" simultané depotassium. Cette expérience prouvait que le rapport de couplage entre les flux actifs de potassium et sodium était différent de 1 et compris entre 2 et 3. Cette estimation, on le notera, était supérieure à celle qu'avaient faite POST et JOLLY sur les hématies. CALDWELL et coll. concluaient que si deux à trois charges Na^+

étaient transportées en même temps qu'une charge de K^+ en sens inverse, la pompe des axones des Cephalopodes devait être électrogène si un équilibre ne pouvait être rétabli par d'autres flux ioniques (tel par exemple qu'un efflux d'ions Cl^-).

Différentes valeurs furent par la suite proposées pour ce rapport de couplage. Celui-ci apparaissait variable selon les auteurs (2Na/1K pour SJODIN et BEAUGE, 1967) et selon les conditions expérimentales (de 1Na / 1K à 3Na / 1K pour MULLINS et BRINLEY, 1969). Ces derniers auteurs en effet, travaillant sur l'axone géant perfusé, montraient que le rapport de couplage augmentait avec la concentration intra-cellulaire en ions Na^+. Dans les conditions normales néanmoins, ce rapport devait être voisin de 3Na/2K.

On peut donc admettre sans risque d'erreur que la pompe Na-K, dans les conditions normales, est électrogène ou "rhéogène" tout au moins.

L'ensemble de ces données trouve sa confirmation dans les travaux récents de THOMAS (1969-1972). Cette analyse expérimentale, en effet, est particulièrement convaincante en raison de son caractère quantitatif et des démonstrations directes qu'elle apporte.

Travaillant sur le corps cellulaire de neurones géants d'Escargot, THOMAS mesure le courant créé par la pompe sodium-potassium dans des conditions de potentiel imposé ("voltage clamp"). Parmi les résultats de cette analyse, on retiendra que :

- la stoechiométrie de la pompe (rapport de couplage) est comprise entre 4Na/3K et 3Na/2K.

- l'intensité du courant de pompe est directement proportionnelle à la concentration intra-cellulaire en sodium au-dessus d'une valeur voisine de 4 mM et à condition que la concentration en ions potassium soit suffisante dans le milieu extra-cellulaire. Il est donc clairement confirmé que l'accroissement de $[Na]_i$ est le signal activateur de la pompe. Celle-ci est mise

au repos dès que la concentration en sodium intra-cellulaire baisse au-dessous d'une valeur seuil.

- l'injection de potassium ou de lithium dans le compartiment intra-cellulaire est incapable d'activer la pompe. Ceci confirme des données antérieures de KEYNES et SWAN (1959) et met en évidence le caractère hautement sélectif du transporteur sur la face interne de la membrane.

- l'absence de potassium dans le milieu extra-cellulaire et la présence d'ouabaïne inhibent le transport de sodium (l'ouabaïne ou strophantine-g est un glucoside cardiaque inhibiteur des transporteurs actifs de Na^+ et K^+ (SCHATZMANN, 1953).

2° - Mécanisme du transport.

Le concept de transporteur membranaire fut introduit pour rendre compte de transports passifs n'obéissant pas aux lois de la diffusion simple (transport de sucres à travers les membranes de globules rouges par exemple).

Le raisonnement repose sur le principe suivant : un transporteur T, dont l'affinité chimique pour un substrat S est forte, réagit avec ce dernier et forme un complexe TS mobile dans la membrane soit :

$$T + S \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} TS$$

La réaction est réversible et dépend des constantes d'association et de dissociation k_a et k_d. La vitesse de la réaction, qui conditionne en fait l'intensité du transport croît comme une fonction hyperbolique de la concentration en substrat S. Il s'en suit que le flux unidirectionnel de S à travers une membrane, n'est pas une fonction linéaire de S (comme on l'attendrait d'un flux diffusionnel) mais une fonction hyperbolique.

Si S est fortement concentré sur une face de la

membrane et faiblement concentré sur l'autre, un gradient de transporteurs mobiles TS apparaît dans la membrane, gradient qui, en définitive, règle l'intensité du flux net de S, d'une face à l'autre de la membrane.

Bien différente est la situation d'un transporteur "actif" dont la mission est de prendre en charge un substrat sur une face de la membrane où ce dernier est peu concentré et de le faire passer, puis de le libérer, sur une face où celui-ci est fortement concentré.

Si l'on envisage le cas simple d'un transporteur non-couplé, on est conduit à admettre que l'affinité du transporteur doit être forte sur une face de la membrane où le substrat est peu concentré et devenir faible ou nulle sur la face où le substrat doit être abandonné. En d'autres termes, la configuration du transporteur doit changer d'une face à l'autre de la membrane.

En outre, la migration orientée du transporteur (que l'on peut admettre de nature diffusionnelle) dans l'épaisseur de la membrane, ne peut être assurée dans la bonne direction que si le complexe TS existe sur la face où S est peu concentré et n'existe pas (ou à concentration très faible) sur la face de la membrane où S est très concentré.

Il résulte de ces considérations qu'un modèle fondé sur une conversion réversible analogue à la précédente ne peut être accepté sans modifications majeures.

La réaction T + S -> TS peut avoir lieu sur la face de départ à condition que T perde son affinité pour S sur la face d'arrivée. Pour cela , un composé X pour lequel T a une très forte affinité convertit T en un nouveau composé D sans affinité pour S. Soit la réaction T + X -> D.

La séquence globale s'écrit donc :

S + T -> TS + X -> D + S
(f.départ) (f. arrivée)

L'une des deux réactions au moins (et les deux éventuellement) demandent pour s'accomplir un apport d'énergie.

CALDWELL (1956), CALDWELL et KEYNES (1957), DUNHAM (1957) et d'autres auteurs à leur suite démontrèrent que les composés phosporés (ATP en particulier) pouvaient être des sources d'énergie utilisables pour le transport Na-K; encore fallait-il qu'un système permette la libération d'énergie et son transfert au transporteur.

La même année, SKOU (1957) isolait d'un homogénat de membrane de nerfs périphériques de Crabe une particule submicroscopique à forte activité enzymatique catalysant l'hydrolyse de l' ATP. Il la nommait ATPase (adénosine triphosphatase).

Il fut démontré plus tard (SKOU, 1960-1962-1964; GLYNN, 1962) que cette ATPase avait des propriétés qui la désignaient comme tout ou partie du transporteur ionique. En effet :

- elle est retrouvée dans différentes membranes cellulaires connues pour transporter activement le sodium et le potassium.

- l'activité ATPasique de l'enzyme, in vitro et en présence de Mg^{2+}, dépend de la concentration en ions Na^{+} et K^{+} présents (SKOU, 1957). Or l'expérience montre que l'activité enzymatique est différente sur une face de la membrane cellulaire et sur l'autre; en effet, les ions Na^{+} sont activateurs de l'ATPase sur la face interne de la membrane de fantômes d'hématies ("ghosts") alors que sur la face externe, les ions K^{+} sont activateurs du même enzyme (GLYNN, 1962).

- SKOU (1960) démontrait que l'ouabaïne réduit beaucoup plus fortement l'activité de l'ATPase si l'enzyme est incubé en milieu pauvre en potassium que s'il l'est en milieu riche. Cette observation était en accord avec les résultats d'une expérience de GLYNN (1957) qui montrait que l'action inhibitrice del'ouabaïne sur les transports actifs était très fortement réduite si du potassium était ajouté dans le milieu. L'observation de SKOU confirmait aussi une donnée expérimentale

importante obtenue en 1959 par CALDWELL et KEYNES; ces auteurs en effet montraient que l'injection d'ouabaïne dans l'axone géant de Calmar ne modifiait pas la vitesse d'expulsion du sodium alors que l'application externe de ce poison réduisait immédiatement et de façon très prononcée le transport de Na^+.

- Il était enfin montré (SEN et POST, 1961-1964 ; GLYNN, 1962; GARRAHAN et GLYNN, 1967) que la stoechiométrie entre le transport actif Na-K dans les membranes de globule rouge et l'hydrolyse de l'ATP résultant de l'activation du système enzymatique par le sodium et le potassium est exactement de $3Na^+$ et $2K^+$ transportés pour une liaison phosphate riche en énergie rompue. En d'autres termes, l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (en ADP + P_i) livre l'énergie requise pour fixer 3 ions Na^+ sur le transporteur au niveau de la face interne de la membrane et 2 ions K^+ sur la face externe.

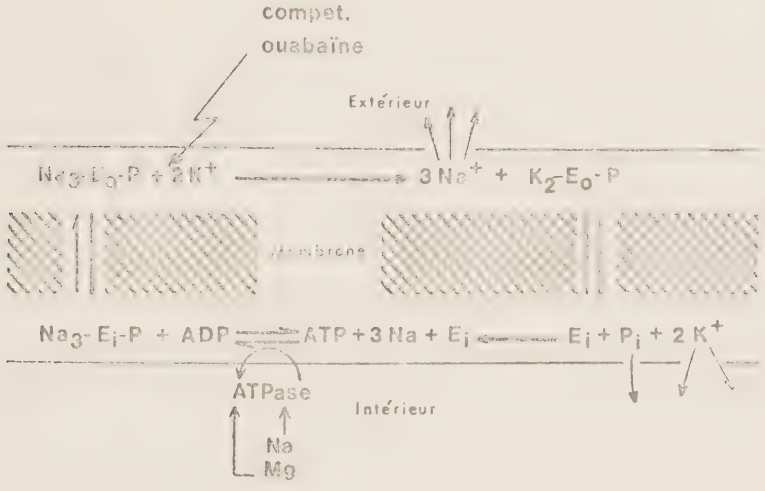
Partant de ces données expérimentales ou d'une partie d'entre-elles , différents modèles de transporteurs cycliques furent successivement proposés et perfectionnés au fur et à mesure de la progression des connaissances.

Un des premiers modèles proposés fut celui de SHAW (1954) rapidement modifié par GLYNN (1956) qui établissait ainsi les bases de tous les modèles actuels, tels ceux de CROSS, KEYNES et RYBOVA (1965), POST, SEN et ROSENTHAL (1965), CALDWELL (1968) et STONE (1968) puis BAKER, BLAUSTEIN, KEYNES, MANIL, SHAW et STEINHARDT (1969).

Dans tous ces modèles, le transporteur change de configuration d'une face à l'autre de la membrane. La conversion aux dépens de l'énergie métabolique a lieu en général sur la face interne sauf dans le modèle de CALDWELL où l'énergie dérivée de l'éclatement de l'ATP sert à la conversion de transporteur Na en transporteur K sur la face externe. Dans ce schéma, l'ATP, qui agit sur la face interne (CALDWELL, HODGKIN, KEYNES, SHAW, 1960) réagit d'abord avec la membrane pour former un intermédiaire riche en énergie qui traverse la membrane et vient agir sur la face externe.

La particularité du modèle de CROSS et coll. est que le transporteur est mobile sous deux formes, libre (chargée) ou combinée.

Nous retiendrons ici le modèle de POST et coll. schématisé ci-dessous :



Sur la face interne de la membrane, le transporteur est dans la configuration Ei. En présence d'une ATPase activée par le sodium et le magnésium, l'hydrolyse d'une molécule d'ATP convertit Ei en un intermédiaire phosphorylé mobile Ei - P capable de transporter 3 ions Na^+. Après translocation du complexe Ei - P - Na_3 d'une face à l'autre de la membrane, le potassium de la face externe déloge le sodium (qui est donc libéré), prend sa place sur l'intermédiaire phosphorylé Eo -P (Eo indique que le site cationique est en relation avec le milieu extérieur) et rompt, lors d'une nouvelle translocation, la liaison phosphore. Phosphore inorganique (Pi) et potassium sont alors libérés sur la face interne où E reprend la configuration Ei. Cette déphosphorylation est inhibée par l'ouabaïne.

On notera que dans ce schéma, le sodium stimule la formation d'un intermédiaire phosphorylé sur la face interne de la membrane, alors que le potassium, sur la face externe (et non sur la face interne), active sa rupture.

[illegible] du potentiel de membrane induites par l'activation de la pompe Na-K.

Comme cela a été dit précédemment, il n'a pas été possible de vérifier le caractère électrogénique du transporteur Na-K des axones de Cephalopodes autrement que sur la base de mesures de flux.

HODGKIN et KEYNES (1955), calculant la variation de potentiel de membrane qui pouvait être attendue, compte-tenu de la valeur des flux, de celle de la résistance de membrane de l'axone et d'un rapport de couplage de 3Na/2K, concluaient que la variation de potentiel créée par la pompe ne pouvait excéder 1,8 mV. Une valeur qui est de l'ordre de grandeur des variations spontanées de potentiel couramment enregistrées in vitro et qui, par conséquent, pouvait difficilement être mise en évidence. La faible valeur de la résistance de membrane de ces axones (1000 Ohms/cm^2) masque donc le caractère électrogénique de la pompe Na-K.

C'est en fait sur les neurones géants de Mollusques (voir THOMAS, 1972) et sur les nerfs amyéliniques de Mammifères que purent être mises en évidence des variations du potentiel de membrane incontestablement associées à l'activation du transport actif de sodium et de potassium.

En 1957, RITCHIE et STRAUB, travaillant sur un faisceau de fibres amyéliniques du tronc sympathique cervical de Lapin, observaient une surpolarisation transitoire qui s'installait après une période d'excitation itérative de la préparation. Les auteurs nommaient "hyperpolarisation post-tétanique" cette surpolarisation de la membrane. L'hyperpolarisation disparaissait en présence de 2-4 dinitrophénol (inhibiteur du métabolisme), d'ouabaïne et de lithium, elle diminuait si la concentration extra-cellulaire en potassium diminuait. Ces résultats étaient donc en bon accord avec un certain nombre de données acquises par HODGKIN et KEYNES notamment.

A cette époque, le caractère électrogénique de la pompe Na-K n'était pas démontré (bien que supposé); aussi RITCHIE et STRAUB, à l'égal de HODGKIN et KEYNES, envisageaient plus volontiers que la pompe fut neutre. RITCHIE et STRAUB expliquèrent donc leurs résultats de la façon suivante :

Lors de l'excitation, le sodium entre dans les fibres nerveuses alors que le potassium en sort. Ces ions K^+ diffusent dans l'espace extra-cellulaire et sont en partie réabsorbés par la pompe. Celle-ci, très active à la fin du tétanos en raison du fort accroissement de $[Na]_i$ (HODGKIN et KEYNES, 1956), expulse activement le sodium et absorbe une grande quantité de potassium. Il en résulte que localement la concentration extérieure en potassium devient inférieure à la normale. Le rapport $[K]_i/[K]_e$ augmentant, le potentiel de membrane devient plus négatif qu'au repos dans les conditions normales et ceci, aussi longtemps que $[K]_e$ reste abaissé par le travail de la pompe.

CONNELLY, en 1959, décrivit dans la Review of Modern Physics les expériences qu'il avait faites sur le nerf sciatique de Grenouille. Supposées intéresser le contingent myélinisé du tronc nerveux, ces expériences mettaient en évidence, après une excitation itérative de plusieurs heures, une hyperpolarisation durable abolie par la substitution de lithium au sodium du Ringer. CONNELLY concluait que cette hyperpolarisation reflétait l'activité d'une pompe Na-K à laquelle il accordait un caractère électrogénique. On verra plus loin que cette dernière conclusion ne peut être acceptée sans restrictions sur la seule base des expériences et des arguments avancés par l'auteur.

Ces expériences sont reprises par STRAUB (1961) sur le nerf tibial de Grenouille. L'auteur, comme CONNELLY, conclut que la pompe des fibres nerveuses du nerf tibial est électrogène. Cette conclusion est fondée sur l'argumentation suivante : constatant que le niveau de polarisation membranaire atteint pendant l'hyperpolarisation post-tétanique peut excéder de 9 mV le potentiel de repos atteint dans un milieu ne contenant pas de potassium, STRAUB déduit que l'hyperpolarisation peut dépasser

le potentiel d'équilibre du potassium. Cette présomption est d'autant plus forte qu'après un tétanos, le potassium perdu par les axones est supposé s'accumuler dans l'espace extra-cellulaire de sorte que le potentiel d'équilibre, à cet instant, est certainement moins négatif que dans un milieu sans potassium.

STRAUB aboutit donc, par des arguments différents mais beaucoup plus convaincants, à la même conclusion que CONNELLY.

Néanmoins, un doute s'introduit dans l'interprétation de l'hyperpolarisation post-tétanique. MOVES (1961) en effet, travaillant sur la fibre nerveuse myélinisée isolée met en évidence une hyperpolarisation transitoire apparaissant après des excitations tétaniques de relativement brève durée (80 à 100 msec); cette hyperpolarisation est insensible au 2-4 dinitrophénol, elle s'accroît dans les milieux sans potassium, diminue si la concentration en ions K^+ est augmentée dans le Ringer, elle s'inverse enfin si la membrane est fortement hyperpolarisée vers un niveau de potentiel qui peut raisonnablement correspondre au potentiel d'équilibre des ions potassium. MOVES démontrait ainsi que l'hyperpolarisation de la fibre myélinisée isolée résulte d'un accroissement de la perméabilité au potassium et ne semble avoir aucun rapport avec une pompe électrogène.

Toujours sur le même type de préparation, et donc selon les auteurs, sur une population de fibres nerveuses myélinisées, HURLBUT (1963), utilisant la méthode des traceurs radioactifs, tente d'évaluer les flux actifs de sodium et potassium. Les conclusions majeures que tire l'auteur de son travail sont les suivantes :

a/ - l'efflux de sodium dépendrait du métabolisme mais serait en grande partie indépendant de la concentration extracellulaire en potassium. Si un couplage existe entre l'efflux actif de sodium et l'influx actif de potassium, il est faible.

b/ - l'échange Na-K global est équimolaire mais ce mouvement, apparemment couplé dans le rapport 1/1 ne requiert pas nécessairement une sortie de sodium, tout autre cation intracellulaire (Li) sortant pouvant entrainer une entrée de potassium.

Tout se passe donc comme si le transport de potassium résultait, en très grande partie du moins, du rétablissement passif de l'électroneutralité du compartiment intra-cellulaire lorsque le sodium sort.

En d'autres termes, on peut interpréter la pensée de HURLBUT en disant que la pompe des fibres nerveuses myélinisées est électrogénique mais le transport de sodium est compensé par une entrée de potassium en sorte que le transport net de charges est nul. Il s'en suit que l'on ne peut espérer mettre en évidence ce caractère électrogénique d'après des variations du potentiel de membrane.

Cette conclusion, jointe à celle de MEVES, est en contradiction évidente avec les interprétations que CONNELLY et STRAUB donnaient de l'hyperpolarisation post-tétanique deux ou trois ans plus tôt.

Il convient de noter ici qu'à la même époque, HOLMES (1962) travaillant sur différents troncs nerveux de Mammifères contenant essentiellement des fibres amyéliniques (sympathique cervical et nerf hypogastrique), retrouvait des résultats qui s'accordaient en partie avec ceux de RITCHIE et STRAUB (1957). HOLMES concluait néanmoins, que ses expériences démontraient le caractère électrogénique d'une pompe Na-K.

Cette conclusion a été analysée et contestée avec juste raison par RITCHIE (1971) dans une revue synthétique récente. RITCHIE fait en effet observer que le potentiel de repos des fibres amyéliniques, et celles de Mammifères en particulier, est très éloigné du potentiel d'équilibre des ions K^+ (ARMETT et RITCHIE, 1963). Or, pendant la période qui suit un potentiel d'action, la perméabilité au sodium est diminuée alors que la perméabilité au potassium est transitoirement accrue par rapport à sa valeur au niveau du potentiel de repos. Il s'en suit que la cellule se comporte comme une " électrode" au potassium et suit beaucoup plus facilement les variations du potentiel d'équilibre des ions K^+. Si celui-ci s'élève du fait de l'absorption de potassium par une pompe (qu'elle soit électrogénique

ou non), la membrane doit s'hyperpolariser et RITCHIE fait observer que ni STRAUB ni HOLMES n'ont levé cette objection par leurs expériences.

On ne peut que suivre RITCHIE sur ce point, d'autant plus volontiers d'ailleurs que HOLMES montrait que l'hyperpolarisation post-tétanique apparaissait plus facilement si le liquide de survie (solutions de Locke ou de Krebs) était acide; or, il est connu (HILLE, 1968) que la perméabilité au potassium des membranes axonales est sensible aux variations de pH.

A l'appui de l'hypothèse de RITCHIE et STRAUB pourraient en principe s'ajouter les conclusions d'un travail de GAGE et HUBBARD (1964) si celles-ci ne prêtaient le flanc à de sérieuses critiques.

GAGE et HUBBARD en effet, pensent démontrer que l'hyperpolarisation post-tétanique du nerf phrénique de Rat procède d'un accroissement de perméabilité au potassium. Afin de le démontrer, les auteurs reconstituent le décours de l'hyperpolarisation d'après l'élévation du seuil d'excitation d'une réponse antidromique portée sur le nerf à la fin d'un tétanos orthodromique imposé dans un milieu riche en potassium (15 mM) ou dans un milieu sans potassium.

Le travail semble indiquer que dans le milieu sans potassium l'hyperpolarisation persiste mais sa durée est plus importante que dans le milieu contenant du potassium. Si la préparation est maintenue plus de 35 minutes dans le milieu sans potassium, la durée de l'hyperpolarisation est abrégée et une dépolarisation est supposée s'installer à sa suite. Ce dernier résultat est interprété de la façon suivante : à la fin d'un tétanos, la perméabilité au potassium est accrûe et la membrane suit les variations du potentiel d'équilibre du potassium. Celui-ci est élevé dans le milieu sans potassium mais, après un séjour prolongé, le compartiment intra-cellulaire perd des ions K^+ (BOYLE et CONWAY, 1941) de sorte que le potentiel d'équilibre E_K est plus bas qu'après un court séjour.

Les critiques suivantes peuvent être faites à ces expériences et leur interprétation.

a/ - Les variations du seuil d'excitation ne sont pas nécessairement le reflet des changements du potentiel de membrane (voir BERGMAN, 1969). En outre, en cas d'échec à l'excitation (ce qui survient immanquablement, d'après les résultats des auteurs pendant une quarantaine de secondes après la fin du tétanos) aucune information ne peut être obtenue sur le niveau réel du potentiel de membrane.

b/ - En admettant que l'hypothèse soit correcte, on ne voit pas pourquoi une variation du potentiel d'équilibre des ions K^+, à la suite d'une fuite de potassium du compartiment intra-cellulaire, pourrait changer le décours temporel d'une hyperpolarisation post-tétanique supposée résulter d'un changement de perméabilité.

c/ - En admettant que la variation du seuil traduise grossièrement le décours de l'hyperpolarisation post-tétanique, on est conduit à constater que celle-ci pourrait aussi bien refléter, si non mieux, l'activation d'une pompe Na-K, électrogénique ou non. On peut en effet admettre qu'après un séjour relativement court dans un milieu ne contenant pas de potassium, tous les ions K^+ ne sont pas évacués de l'espace extra-cellulaire de sorte que la pompe fonctionne aussi longtemps que la concentration intra-cellulaire en sodium est supérieure à la normale (le déficit en ions K^+ dans le milieu extra-cellulaire n'étant pas encore suffisant pour bloquer la pompe et la sortie de potassium, pendant le tétanos, réapprovisionnant l'espace extra-cellulaire). Après un séjour prolongé dans le milieu sans potassium, la pompe ne fonctionnera que pendant une courte période, celle pendant laquelle, à la suite d'un tétanos, l'espace extra-cellulaire réapprovisionné contient du potassium. On voit que dans cette hypothèse, l'hyperpolarisation peut aussi bien refléter le caractère électrogénique d'une pompe que la variation de E_K (détectée par la membrane passive) consécutive à son activation.

Nous considérerons par conséquent qu'il n'est pas démontré, dans les expériences de GAGE et HUBBARD, que l'hyperpolarisation post-tétanique procède d'un accroissement de perméabilité au potassium. On ajoutera pour être complet que rien non plus n'exclut cette hypothèse.

L'interprétation de l'hyperpolarisation post-tétanique devait être une fois de plus remise en cause en 1968 et ceci, par RITCHIE lui même en collaboration avec RANG.

Utilisant toujours comme préparation le faisceau de fibres amyéliniques de Mammifères, RANG et RITCHIE démontrent que l'hyperpolarisation post-tétanique du nerf vague traduit, en partie au moins, le caractère électrogénique d'une pompe qui reste responsable de variations de la concentration extra-cellulaire en potassium détectables par la membrane passive.

L'argumentation repose sur deux faits expérimentaux majeurs :

a/ - la substitution d'anions "imperméants" (isethionate) aux ions chlorure du milieu extra-cellulaire augmente la résistance de membrane et l'amplitude de l'hyperpolarisation post-tétanique.

b/ - l'absence de potassium dans le milieu extérieur abolit l'hyperpolarisation post-tétanique mais le rétablissement de la concentration en potassium, après qu'une stimulation tétanique ait eu lieu, induit une deuxième hyperpolarisation transitoire. Celle-ci est interprétée, sur la base d'arguments indiscutables, comme une réactivation de la pompe analogue à celle que KERKUT et THOMAS (1965) ont pu mettre en évidence sur les neurones géants d'Escargot . Si de l'ouabaïne est ajoutée au milieu, le même apport de potassium ne provoque plus qu'une dépolarisation.

Ainsi, RANG et RITCHIE pouvaient-ils mettre en évidence une réponse de pompe sodium, couplée au potassium et néanmoins électrogénique. Cette réponse présente le très grand intérêt de ne plus être compliquée par un changement de perméabilité passive consécutif au tétanos.

Les auteurs allaient se servir de cette réponse activée par le potassium, et amplifiée en présence d'anions imperméants, pour analyser les modalités d'activation de la pompe.

Pour une concentration en sodium intra-cellulaire supposée constante, l'amplitude de la réponse croît avec la concentration en potassium dans le milieu extra-cellulaire, elle atteint une valeur maximale pour la concentration normale (5 mM). Cette réponse "potassium activable" est insensible aux variations du potentiel de membrane et à la teneur en calcium du milieu extra-cellulaire.

Contre toute attente cependant, la réponse au potassium apparaît d'autant plus ample que le milieu extra-cellulaire est pauvre en sodium. Ce résultat surprenant, non expliqué par RAIG et RITCHIE depuis lors, va exactement à l'inverse de données que l'on pouvait considérer comme définitivement admises (voir entre autres HODGKIN et KEYNES, 1956; THOMAS, 1969).

Cependant, malgré cette particularité, la réponse activable par le potassium s'est avérée être, au cours des trois dernières années, un précieux témoin de l'activité du transporteur sodium-potassium.

L'hyperpolarisation post-tétanique a été utilisée par Den HERTOG, GREENGARD et RITCHIE (1969) pour analyser le métabolisme intermédiaire des sources d'énergie utilisées par le système transporteur.

Mais en même temps, Den HERTOG et RITCHIE (1969) ont pu, grâce à la réponse activée par le potassium analyser les modalités d'action des inhibiteurs du transport actif.

On notera pour terminer que LANDOWNE et RITCHIE (1971) ont récemment mesuré des changements de fluorescence reflétant les variations du taux d'adénosine diphosphate (ADP) intracellulaire et montré une corrélation entre le décours de la réponse au potassium et celui de la variation lente de fluorescence.

A l'issue de cette analyse non exhaustive de la littérature portant sur le transport actif dans les cellules nerveuses, on ne manquera pas de retenir les difficultés qui peuvent être rencontrées dans la recherche et l'établissement de preuves de l'activation d'un système transporteur actif sur la seule base des variations du potentiel de membrane.

Une controverse qui a récemment opposé KEHOE et ASCHER (1970) à PINSKER et KANDEL (1969) est, à ce titre, un exemple particulièrement démonstratif. Sous le titre "Synaptic activation of an electrogenic sodium pump", PINSKER et KANDEL décrivaient une réponse synaptique inhibitrice en deux phases dans un neurone de Mollusque. La phase initiale, rapide était attribuée à un changement de perméabilité au chlore et une deuxième phase, retardée, était interprétée comme résultant de l'activation d'une pompe électrogénique. Les raisons étaient les suivantes : la phase retardée ne s'inversait pas avec l'hyperpolarisation de la membrane; elle était abolie par l'ouabaïne, le refroidissement de la préparation et le lavage prolongé par une solution dépourvue de potassium.

A peu près à la même époque, KEHOE avait observé, sur des neurones d'un autre ganglion, une double réponse inhibitrice dont la première phase dépendait d'un changement sélectif de perméabilité au chlore comme celle que décrivaient PINSKER et KANDEL, mais la deuxième phase, retardée, résultait d'un changement sélectif de perméabilité au potassium.

Frappés par la similitude des phénomènes, KEHOE et ASCHER ont réanalysé la deuxième réponse et confirmé la première interprétation de KEHOE. Les effets de l'ouabaïne, de l'abaissement de température et de la suppression de potassium furent alors expliqués de la façon suivante :

Les trois agents inhibent effectivement l'activité de la pompe au sodium et potassium; il en résulte une fuite nette de potassium du compartiment intra-cellulaire et une accumulation de ce cation dans l'espace extra-cellulaire. Il s'en suit une diminution du potentiel d'équilibre du potassium et donc,

une réduction puis une abolition de la phase retardée de la réponse synaptique qui tend à suivre les valeurs de E_K.

Cet exemple, choisi à dessein en raison de sa portée générale, montre que les inhibiteurs du transport actif, que l'on a tendance à considérer comme les critères les plus solides pour identifier l'activité d'une pompe Na-K, sont en fait très insuffisants par eux-mêmes et doivent être utilisés en association avec une analyse détaillée fondée sur d'autres critères.

C H A P I T R E II

ANALYSE CRITIQUE DE CERTAINES DONNEES DE LA LITTERATURE ET OBJECTIFS EXPERIMENTAUX.

Comme l'indiquent le titre de ce mémoire et son chapitre d'introduction, notre objectif a été d'analyser l'origine et les caractères de l'hyperpolarisation post-tétanique d'un nerf périphérique généralement considéré comme constitué de fibres myélinisées et, à ce titre, fréquemment utilisé par les physiologistes.

L'examen attentif de la littérature montre en définitive que peu de travaux ont été consacrés à l'étude du transport actif de sodium et de potassium dans les fibres myélinisées.

La raison la plus évidente est que cette préparation est très probablement la moins recommandable pour étudier cette catégorie de transports. En effet, ces fibres nerveuses apparaissent indiscutablement comme des "câbles" perfectionnés par la nature en vue d'assurer, aussi rapidement que possible, la conduction d'informations codées, sous le moindre encombrement et au coût énergétique le plus bas.

Cette dernière remarque a pour implication directe que l'intensité des transports est faible et, par conséquent, difficilement mesurable.

Il n'est donc pas étonnant que les mesures de flux faites par HURLBUT (1963) sur le nerf sciatique de Grenouille aient abouti à des résultats et des conclusions qui apparaissent finalement peu orthodoxes si on les compare à ceux et celles qui ont été tirés d'expériences faites sur des préparations beaucoup plus favorables à ces études.

Comme les pages précédentes l'ont montré en effet, l'étude de ces transports a été faite, dans la grande majorité des cas, sur des troncs nerveux entiers ou des faisceaux comportant, certes un grand nombre de fibres myélinisées, mais

aussi une proportion non négligeable et très probablement sous-estimée d'axones amyéliniques.

Il s'en suit que des erreurs d'interprétation importantes peuvent avoir été faites, notamment en ce qui concerne les mesures de flux évalués par la technique des traceurs.

Dans ce type de mesure en effet, l'intensité des flux est directement proportionnelle à la surface de membrane des axones. Or, si l'on admet, ce qui est très probable, que les échanges ioniques entre les deux compartiments cellulaires de l'axone myélinisé ont lieu à travers la membrane nodale, on aboutit à la conclusion que pour une longueur de 2 mm environ, la surface d'échange d'une fibre myélinisée de 15 µm de diamètre est environ 300 fois plus faible que celle d'un axone amyélinique de 0,5 µm.

En d'autres termes, même si l'on admet (ce qui est absurde) que le nombre de fibres amyéliniques d'un tronc nerveux mixte de Grenouille est 300 fois plus petit que celui des fibres myélinisées, les surfaces de membranes développées seraient égales pour les deux catégories de fibres considérées.

On voit donc que dans ces conditions, il serait délicat d'évaluer les contributions relatives d'une catégorie d'axones par rapport à l'autre.

La situation réelle est beaucoup plus défavorable encore car, ainsi que nous le démontrerons au début de notre travail, le nombre de fibres amyéliniques du nerf sciatique de Grenouille est approximativement égal à celui des axones myélinisés.

On peut donc dire qu'au repos (conditions expérimentales de HURLBUT) la contribution des axones amyéliniques aux flux globaux mesurés est probablement plusieurs centaines de fois plus élevée que celle des fibres myélinisées.

Il semble peu raisonnable, dans ces conditions, de déduire de ces mesures la part prise par les axones myélinisés.

CONNELLY et STRAUB, indépendamment, ont pensé pouvoir déduire de leurs expériences que la pompe Na-K des fibres myélinisées est électrogéne.

Nous tentons de démontrer qu'en fait il n'est pas prouvé que :

a/ - ces auteurs ont effectivement travaillé sur les fibres myélinisées du nerf sciatique de Grenouille.

b/ - l'hyperpolarisation post-tétanique qu'ils ont mise en évidence résulte de l'activation d'une pompe Na-K.

c/ - la pompe est effectivement électrogène.

En effet, CONNELLY et STRAUB admettent qu'ils travaillent sur une population d'axones myélinisés alors que leur protocole expérimental ne permet pas de penser que des précautions ont été prises pour que les fibres myélinisées seules soient excitées.

En admettant que seules ces fibres nerveuses aient été effectivement stimulées, on ne peut exclure qu'une sortie de potassium de ces axones au cours du tétanos ne constitue, par elle-même, un stimulus activateur de la pompe des fibres amyéliniques voisines (voir RANG et RITCHIE, 1968).

CONNELLY (et STRAUB à sa suite) conclut que la post-hyperpolarisation reflète l'activité d'une pompe puisque ce phénomène est aboli par le chlorure de lithium. Bien que cet argument soit effectivement favorable à la thèse défendue par ces auteurs, il ne peut constituer par lui-même une démonstration suffisante.

L'argument est insuffisant car, si l'on admet que le lithium n'est effectivement pas pris en charge par le transporteur et qu'en conséquence le transport actif de cations est bloqué, on peut s'attendre, après un tétanos, à une accumulation de potassium dans l'espace extra-cellulaire et donc, à une diminution du potentiel d'équilibre des ions K^+ agravée d'ailleurs par une réduction de $[K]_i$.

Il s'en suit qu'une hyperpolarisation post-tétanique

qui, dans les conditions normales, résulterait d'un accroissement banal de perméabilité au potassium, disparaîtrait en présence de lithium comme si elle procédait de l'activation post-tétanique d'une pompe (voir KERNOM et ARCHER 1970).

La possibilité qu'un accroissement de P_K rende compte de l'hyperpolarisation post-tétanique est d'autant plus plausible que MEVES (1961), travaillant sur la fibre myélinisée isolée, a démontré sans ambiguité que ce phénomène est insensible à l'action du 2-4 dinitrophénol et suit les variations du potentiel d'équilibre du potassium.

Si enfin, la pompe était comme le pensent CONNELLY et STRAUB de nature électrogénique, on voit mal pour quelles raisons MEVES n'aurait pu la mettre en évidence sur la fibre isolée.

Deux arguments supplémentaires peuvent être utilisés contre les conclusions de CONNELLY et STRAUB :

a/ - BERGMAN (1970), travaillant dans des conditions de voltage clamp sur la membrane nodale de l'axone myélinisé, étudie les variations du potentiel d'équilibre des ions sodium après des salves d'impulsions brèves ajustées de façon à charger le compartiment intra-cellulaire en sodium. Il montre que des salves, de très courte durée sont susceptibles de faire varier notablement la concentration intra-cellulaire en ions Na^+ mais il ne peut mettre en évidence, bien qu'il l'ait recherché, le courant sortant de cinétique lente que l'on est en droit d'attendre (voir THOMAS, 1969) si la pompe Na-K des fibres myélinisées est effectivement électrogène.

b/ - Différentes analyses faites par la technique des traceurs montrent que les flux actifs de potassium et sodium mesurés sur l'axone géant de Calmar sont inégaux, ce qui confère un indiscutable caractère électrogène au système transporteur de ce type de membrane. Or, HODGKIN et KEYNES (1955), et d'autres à leur suite, n'ont pu mettre en évidence de variation nette du potentiel de membrane à la suite d'excitation prolongée de ces axones.

Il ne fait donc aucun doute que le caractère électrogénique de la pompe est masqué par une trop basse résistance de membrane passive.

La résistance spécifique de l'axone géant est de 1 000 Ohms/cm^2; celle de la membrane nodale de la fibre myélinisée est généralement évaluée à une dizaine d'ohms par centimètre carré (DODGE et FRANKENHAEUSER,1957) soit, une valeur cent fois plus faible que celle de l'axone géant.

On voit mal, dans ces conditions, même si l'on admet que la pompe des fibres myélinisées est aussi active que celle de l'axone géant, comment un caractère électrogène éventuel serait décelable sur la fibre myélinisée s'il ne l'est pas sur une membrane cent fois plus résistante.

En supposant enfin que l'hyperpolarisation mise en évidence par CONNELLY et analysée par STRAUB, résulte effectivement de l'activation d'une pompe Na-K, on peut facilement démontrer qu'il n'est pas nécessaire de faire appel à un système transporteur électrogénique pour rendre compte des variations de potentiel mesurées. Il suffit en effet, pour expliquer le phénomène dans les termes de RITCHIE et STRAUB (1957), que la perméabilté de la membrane passive soit fortement augmentée pour le potassium à la fin du tétanos par rapport à sa valeur stationnaire au niveau du potentiel de repos. Une pompe neutre serait suffisante dans ce cas pour créer l'hyperpolarisation observée; les expériences de MEVES permettent de penser que cette interprétation est raisonnable.

A l'issue de cette revue des données actuelles de la littérature sur le transport actif de sodium et potassium dans les fibres myélinisées, il nous est apparu que les différents arguments avancés pour démontrer que l'hyperpolarisation post-tétanique de troncs nerveux mixtes procède de l'activation d'une pompe Na-K ne résistent pas, en fait, à une analyse critique fondée sur des connaissances récemment acquises dans ce domaine.

Ces raisons nous ont amenée à conclure que l'étude de l'hyperpolarisation post-tétanique du nerf sciatique devait être reprise.

Notre travail a d'abord consisté à évaluer la proportion de fibres myélinisées et amyéliniques dans le nerf sciatique de Grenouille.

Utilisant ensuite la technique d'enregistrement par électrodes externes dite du "double espace saccharose", nous avons analysé les caractères de l'hyperpolarisation dans des conditions physiologiques normales. Nous avons ainsi pu montrer ses variations en dépendance de la durée et de la fréquence des excitations tétaniques et nous avons analysé son décours temporel.

Dans une troisième étape, nous avons essayé, par différentes voies d'approche, de savoir si l'hyperpolarisation post-tétanique résultait d'une augmentation de perméabilité au potassium ou de l'activation d'une pompe Na-K.

Il est apparu que la deuxième hypothèse, bien qu'elle n'exclue pas la première, devait être retenue.

Nous avons ensuite essayé de savoir si la pompe était électrogène ou neutre.

Une autre de nos préoccupations, pendant toute la durée du travail, a été de savoir si l'hyperpolarisation post-tétanique (HPT) enregistrée était le résultat de l'activation du contingent de fibres myélinisées ou amyéliniques du nerf sciatique.

Comme on le verra, le travail démontre sans ambiguité pensons nous que l'hyperpolarisation reflète l'activation de la pompe Na-K des fibres myélinisées. La variation de potentiel de membrane n'est pas attribuée au caractère électrogène de la pompe mais à des variations du potentiel d'équilibre du potassium, décelées par la membrane passive et résultant de l'absorption active de potassium depuis l'espace extra-cellulaire.

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA PREPARATION DU NERF SCIATIQUE DE GRENOUILLE ET METHODES EXPERIMENTALES.

Les considérations développées dans les pages précédentes montrent que l'étude du transport actif de sodium et potassium dans les fibres myélinisées est un problème complexe pour des raisons purement techniques.

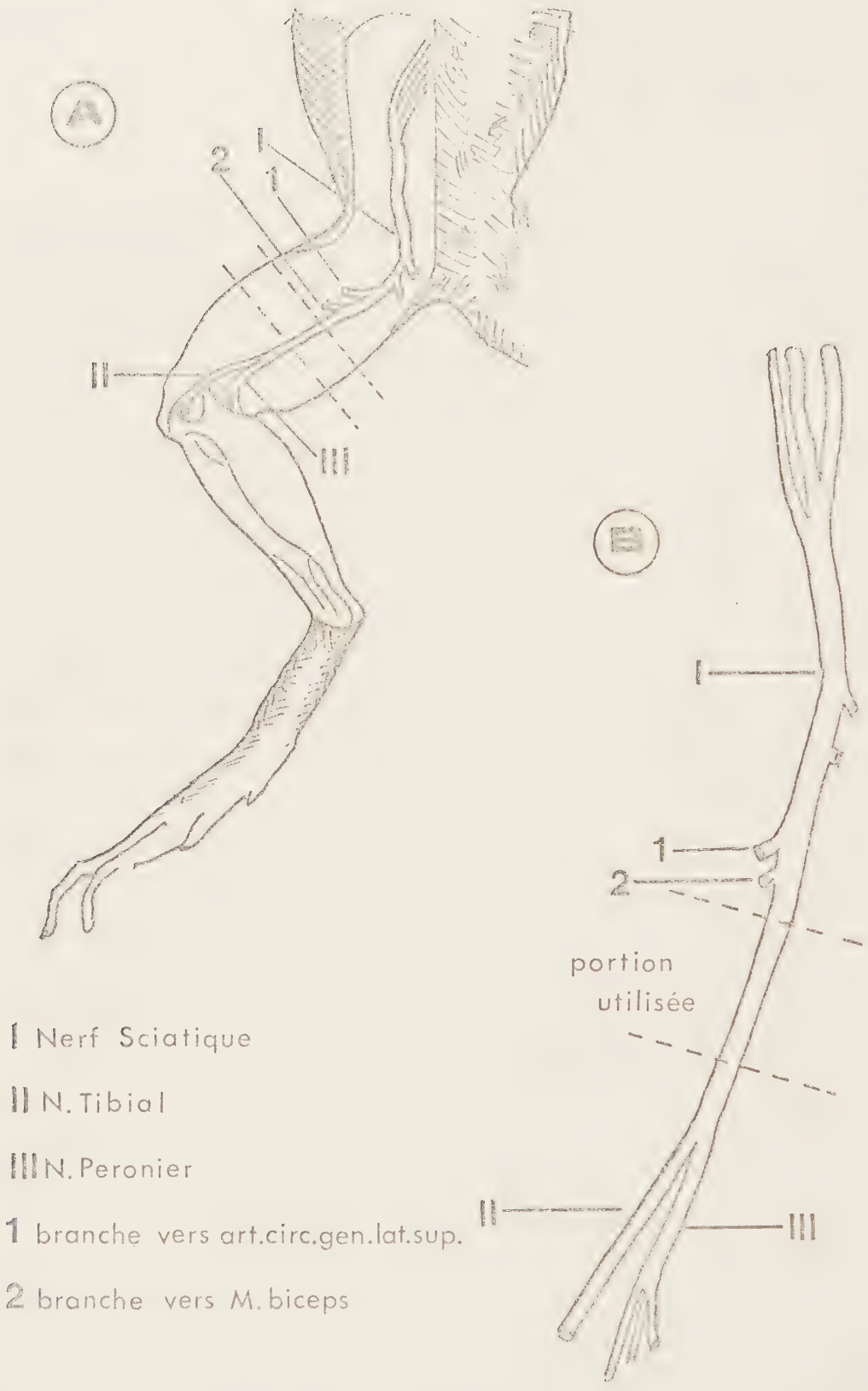
La méthode des traceurs radioactifs serait a priori la technique de choix dans la mesure où elle permet habituellement une évaluation quantitative des flux unidirectionnels et apporte par là même des évidences expérimentales directes.

Nous pensons avoir cependant démontré qu'une telle méthode se heurte à d'énormes difficultés d'interprétation dès que l'on se propose d'estimer la contribution des fibres myélinisées aux échanges ioniques mesurés dans un tronc nerveux mixte (même si ce dernier ne contient qu'une faible proportion d'axones amyéliniques).

Il semble donc plus raisonnable de faire appel à une technique totalement différente permettant d'étudier le transport actif par le biais de ses manifestations indirectes : les variations du potentiel de membrane (et plus précisément de l'hyperpolarisation post-tétanique). Encore faut-il démontrer que celles-ci reflètent effectivement l'activité d'une pompe, électrogène ou non.

La mesure des variations du potentiel de membrane, dans le cas d'un tronc nerveux, fait nécessairement appel à la technique de dérivation par électrodes externes.

Une telle technique a pour défaut principal celui d'apporter des informations qui sont en général compliquées par l'existence de résistances extra-cellulaires variables. Malgré ce défaut, l'intérêt de cette technique est qu'elle permet d'espérer, en ajustant les paramètres de stimulation, une



- Planche 1 -

Schéma de la préparation.

A : Trajet du nerf sciatique in situ (face dorsale).

B : Schéma du tronc nerveux isolé.

activation sélective du contingent myélinisé du tronc nerveux.

Il est clair cependant que l'interprétation des résultats, compte-tenu du caractère hétérogène de ce type préparation, passe par le recensement de sa population en fibres myélinisées et amyéliniques et surtout, par une estimation de l'importance relative de ces deux contingents.

Description macroscopique de la préparation.

Sauf cas exceptionnels, nous avons toujours travaillé sur des grenouilles (R.esculenta) stockées en chambre froide à une température approximativement constante voisine de 5°C.

Après décérébration et sacrifice de l'animal, le nerf sciatique était excisé selon une technique classique, par la face dorsale, entre les émergences lombo-sacrées et l'articulation du genou (fig. 1A).

Le tronc nerveux isolé comportait donc (fig. 1B)

- vers son extrémité distale : deux rameaux sectionnés au niveau de l'articulation du genou , les nerfs péronier et tibial.

- vers son extrémité centrale : trois faisceaux issus du névraxe et convergeant vers le tronc sciatique.

Les mesures de potentiel ont été faites sur une portion homogène du nerf, correspondant *in situ* à la partie moyenne de la cuisse comprise entre la bifurcation péronier-tibial d'une part et l'origine des branches innervant les muscles biceps et genouillé latéral d'autre part. Pour cette raison, l'examen microscopique et les comptages de fibres ont été faits sur des coupes transversales intéressant cette région du nerf sciatique.

Etude microscopique du nerf sciatique : comptage de fibres.

Les préparations ont été obtenues selon le procédé suivant :

Dès son excision, le nerf était fixé pendant une heure dans une solution isotonique contenant du tetroxide d'osmium à 2% et un tampon phosphate à une concentration de 0,07 M (pH compris entre 7,2 et 7,4). La préparation était ensuite lavée dans la même solution tampon (sans osmium) puis déshydratée par des trempages successifs dans des solutions alcooliques de plus en plus concentrées. La déshydratation finale était obtenue par trempage dans l'acétone. Après évaporation, l'échantillon était inclu dans l'araldite.

Les inclusions ainsi obtenues étaient ensuite sectionnées au microtome en coupes semi-fines de 1 µm d'épaisseur puis colorées au bleu de toluidine en présence de borax.

Les coupes ont été examinées au microscope optique muni d'un objectif à immersion puis, photographiées sur film 35 mm. Les comptages ont été faits sur des épreuves positives dont les dimensions correspondaient à un agrandissement final de 1 000 fois.

La figure 2 représente une coupe reconstituée à partir de différents tirages positifs. Les fibres myélinisées, en section transversale, sont isolées les unes des autres et se reconnaissent à leur contour opaque (myéline) et semblent occuper la totalité de la section; l'axoplasme de ces fibres est clair.

A plus fort grossissement (fig. 3), l'examen attentif des coupes révèle de petits amas gris, dispersés entre les fibres myélinisées. Il s'agit de petits faisceaux de fibres amyéliniques comportant 5 à 30 axones. Le contour de chaque axone est matérialisé par un cerne un peu plus sombre que l'axoplasme.

Au niveau de la section de sciatique présentée dans la figure 2, les deux grandes catégories de fibres se répartissent comme suit :

- Figure 2 -

Coupe transversale du nerf sciatique de Grenouille (x 165).

cellule
de Schwann
fibres
myélinisées
fibres
amyéliniques
périnèvre

fibres myélinisées : 2 793 soit 47% du total

fibres amyéliniques : 3 122 soit 53% du total

total : 5 915 fibres.

On voit donc, et contre toute attente, que le nombre de fibres amyéliniques est au moins égal à celui des fibres myélinisées.

Il est très probable que le contingent amyélinique du sciatique a été longtemps sous-estimé comme l'a été celui du nerf vague de Mammifères (voir comptages effectués par EVANS et MURRAY en 1954 et par KEYNES et RITCHIE en 1965). La sous-estimation provient très certainement de ce que les fibres amyéliniques sont toujours groupées en faisceaux qui, si la technique de coloration n'est pas exactement appropriée, sont comptés pour une fibre ou un nombre d'axones très inférieur à la réalité.

Il est intéressant de noter, en ce qui concerne les Batraciens, que RUD (1961) et SCHMIDT (1962) évaluent à 16% la proportion de fibres amyéliniques par rapport à la population totale du nerf tibial de Grenouille. Cette proportion est environ trois fois plus faible que celle qui ressort de nos comptages. Il nous semble peu probable que la différence puisse être attribuée au fait que nos coupes intéressent un segment plus proximal d'un tronc périphérique commun aux deux préparations.

Compte-tenu de nos résultats, il peut sembler paradoxal que le nerf sciatique de Grenouille soit considéré comme un nerf "myélinisé". La raison est très probablement que le "comportement électrophysiologique" de cette préparation, en dépit d'un pourcentage élevé de fibres amyéliniques, reste en fait celui d'un ensemble homogène de fibres myélinisées. Les pages suivantes permettront d'en comprendre les raisons.

Mesure du potentiel de membrane : dérivation par électrodes externes.

Il est possible, sur une structure pluri-cellulaire,

de mesurer des différences de potentiel entre deux électrodes appliquées à la surface de la préparation.

Cette d.d.p. représente, à un facteur d'atténuation près, la force électromotrice résultante d'un grand nombre de batteries de membrane associées en parallèle.

La différence de potentiel mesurée peut être considérée comme l'image du potentiel de membrane moyen du type cellulaire dominant dans la préparation. Par extension, et au prix de certaines réserves, la préparation peut être considérée comme une seule cellule et dans le cas d'un nerf, comme un axone isolé.

Si l'on considère le nerf isolé comme un axone unique, la d.d.p. mesurée entre deux électrodes extra-cellulaires est égale au potentiel de membrane (d.d.p. existant entre les faces externe et interne de la membrane) à un facteur de proportionnalité près qui est :

$$k = \frac{Re}{Re + Ri}$$

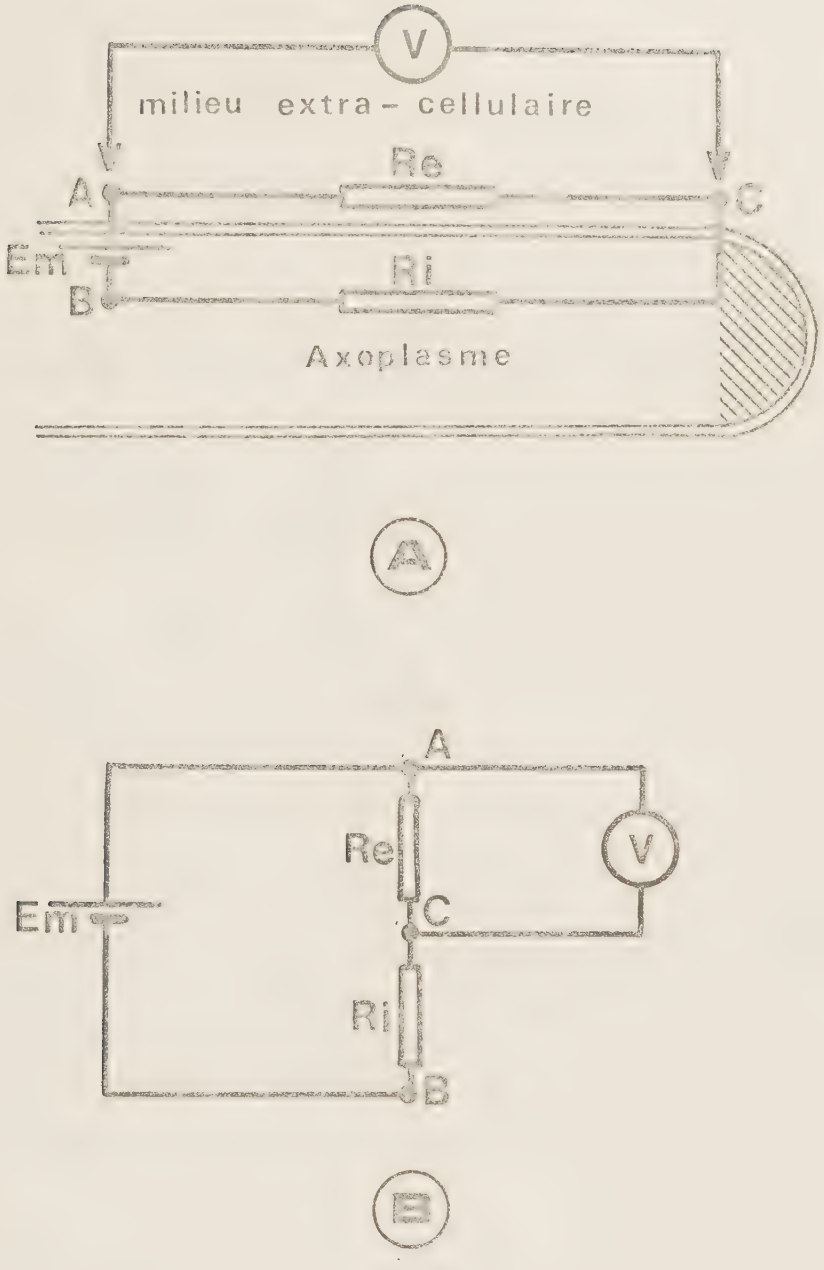
où Re est la résistance longitudinale externe comprise entre les deux électrodes d'enregistrement et Ri la résistance axoplasmique correspondant au segment d'axone compris entre les deux électrodes d'enregistrement (La résistance de membrane Rm est supposée négligeable devant Ri dans cette expression; en toute rigueur, k devrait être : Re / Re + Ri + Rm).

En effet,

- si l'on appelle Em le potentiel de membrane matérialisé dans la figure 4A par une batterie inclue entre les points A et B.

- si l'on dispose deux électrodes d'enregistrement aux points A et C sur la face externe de l'axone.

- si la batterie de membrane est annulée au point C par un traitement approprié de la préparation en ce point,



- Figure 4 -

A : mesure du potentiel de membrane Em par électrodes externes (A et C). Re est la résistance longitudinale externe, Ri est la résistance longitudinale interne de la préparation. La résistance de membrane est supposée négligeable.

B : circuit équivalent simplifié : la d.d.p. mesurée entre A et C est une fraction de la résistance totale (Re + Ri) dans laquelle débite le générateur Em.

la d.d.p. $V_A - V_C$ mesurée sera l'expression de la d.d.p. $V_A - V_B$ multipliée par le "facteur de court-circuit" Re / Re + Ri soit :

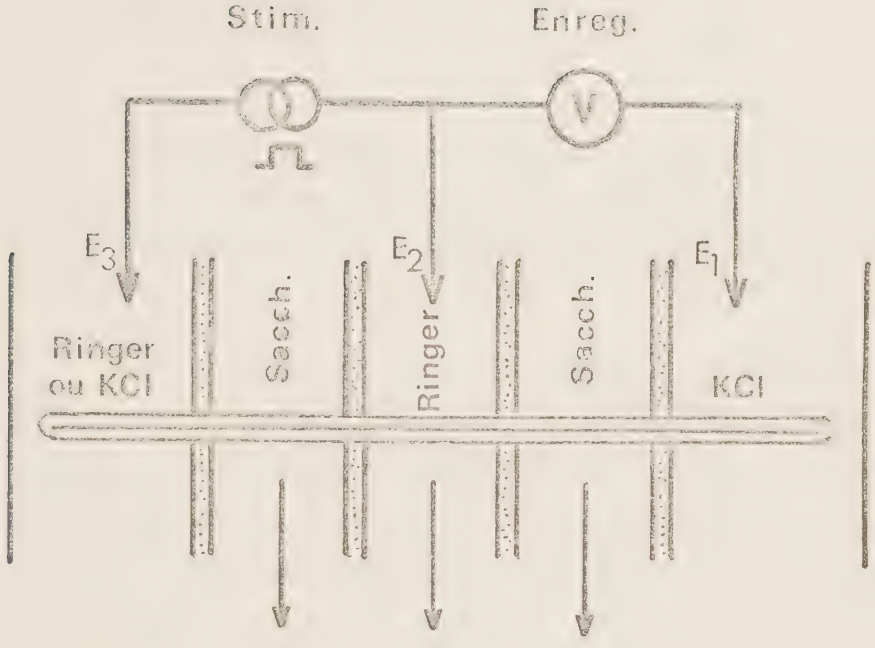
$$V_A - V_C = V_A - V_B \left(\frac{Re}{Re + Ri}\right) = Em \left(\frac{Re}{Re + Ri}\right)$$

On voit en effet (fig. 4B) que le schéma équivalent du circuit est un pont diviseur dans lequel la d.d.p. mesurée est une fraction de la d.d.p. apparaissant aux bornes de la résistance totale Re + Ri dans laquelle débite le générateur Em.

On conçoit que la valeur réelle du potentiel de membrane soit a priori mesurable directement si le rapport Re / Re + Ri est égal à 1.

En pratique, cette valeur idéale peut être approchée si, par un artifice expérimental, Ri devient négligeable par rapport à Re. Ri ne peut être changé mais Re peut être fortement augmenté si une solution aussi peu conductrice que possible lave l'axone sur une courte longueur comprise entre les deux points d'enregistrement A et C. On peut voir alors (fig. 4B) que la résistance totale du circuit devient très grande et l'on peut admettre que la batterie ne débitant pratiquement pas, la mesure de Em est faite dans des conditions quasi-électrométriques(à condition évidemment, ce qui est sous-entendu, que la résistance interne de la batterie soit négligeable devant Re + Ri).

Partant de ce principe, STÄMPFLI (1954) a proposé une méthode de mesure du potentiel de repos dans laquelle un faisceau nerveux, dépouillé de sa gaine externe (perinèvre) est lavé, au niveau de l'une des électrodes d'enregistrement par une solution isotonique de KCl (annulant le potentiel de membrane en ce point et rendant la membrane inexcitable) et au niveau de l'autre électrode, par une solution de Ringer (ou toute autre solution "test"). Entre les deux électrodes, une solution isotonique de saccharose, aussi pure et peu conductrice que possible,



- Figure 5 -

Schéma de principe de la mesure du potentiel de membrane et du potentiel d'action par la technique du "double espace saccharose".

La préparation est lavée par le saccharose et le Ringer. Elle est stimulée par 2 électrodes E_2 et E_3. L'enregistrement est effectué par les électrodes E_1 et E_2.

s'écoule et lave en permanence le faisceau nerveux.

Sur de petits faisceaux nerveux de Grenouille, STAMPFLI a pu obtenir par cette méthode des valeurs du potentiel de repos représentant 90% environ de la valeur mesurée sur une fibre myélinisée isolée.

Le principe fondamental de cette technique a été largement utilisé par la suite et appliqué à toutes sortes de préparations (axone géant de Céphalopodes ou Crustacés, muscles lisses de Mammifères, fibres musculaires squelettiques et cardiaques).

Si un deuxième "espace saccharose" est intercalé entre deux électrodes de stimulation (fig. 5), il devient possible d'enregistrer non seulement le potentiel de repos mais aussi le potentiel d'action global du faisceau avec, en principe, le même facteur de court-circuit que celui qui vient d'être défini.

Par convention, cette technique est appelée "technique du double espace saccharose" (double sucrose gap des auteurs anglo-saxons).

SCHMIDT (1961) a développé une version particulièrement bien adaptée à la mesure du potentiel de repos, du potentiel d'action et de la résistance de membrane des fibres myélinisées du nerf tibial de Grenouille.

Signification des mesures obtenues par la technique du double espace saccharose.

On comprend aisément, compte-tenu de ce qui vient d'être dit, que les performances de la technique dépendent essentiellement de la valeur de Re. L'objet de ce paragraphe est d'interpréter la signification de Re et celle de Em, dans le cas particulier d'un tronc nerveux entier comportant une population égale de fibres myélinisées et de fibres amyéliniques de petit diamètre.

Pour un nerf entier, Re apparent est la somme de

différentes résistances associées en parallèle et qui sont :

a/ - la résistance du milieu extra-cellulaire (solution électrolytique de faible résistivité).

b/ - la résistance électrique des tissus inertes tels que le périnèvre, l'endonèvre et les fibres nerveuses détruites au cours de la dissection.

c/ - la résistance équivalente des axones dont le potentiel de membrane, à un instant donné, diffère, pour une raison ou une autre, de celui de la majorité des fibres de la préparation.

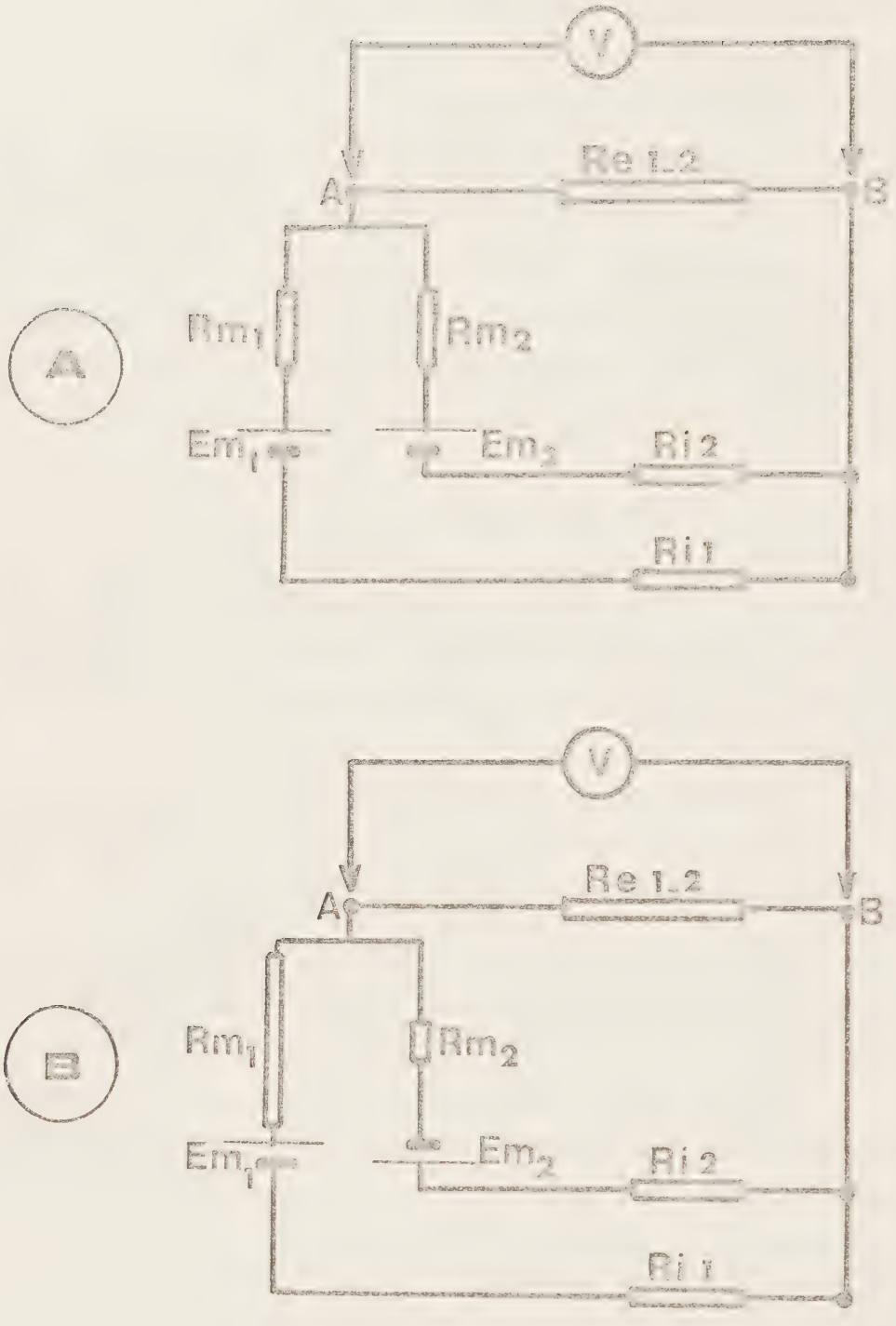
Comme on l'a dit, précédemment, Re peut être augmenté en retirant le périnèvre et en lavant la préparation par une solution non-conductrice évacuant les électrolytes du milieu extra-cellulaire. Par ailleurs, il est évident que l'endonèvre représente un facteur limitant l'accroissement de Re pour deux raisons :

- sa résistance propre, irréductible, et le fait que cette trame conjonctive soit un obstacle à la diffusion de la solution non conductrice dans l'espace extra-cellulaire.

En supposant que les facteurs a et b soient constants pour une préparation donnée, il convient maintenant d'analyser le troisième facteur (c), de loin le plus complexe.

On considère (fig. 6) deux axones dont les batteries de membrane Em_1 et Em_2 ont pour résistances internes Rm_1 et Rm_2 respectivement. La résistance externe (Re_{1-2}), commune aux deux axones entre les points de mesure A et B, est constante et représente les facteurs a et b mentionnés précédemment. Les résistances longitudinales internes de chacun des axones Ri_1 et Ri_2 sont constantes aussi et supposées grandes par rapport à la variation ΔRm éventuelle des résistances Rm_1 et Rm_2 (ce qui correspond à la réalité si la distance A - B est supérieure à 2 mm environ).

Deux cas limites peuvent être envisagés :



- Figure 6 -

Le facteur court-circuit varie avec l'état de repos ou d'activité des axones.
A : Schéma électrique équivalent de 2 axones dans le même état. Les batteries de membrane Em_1 et Em_2 (de valeurs égales) sont associées en parallèle. Entre A et B on enregistre le potentiel de membrane équivalent à celui d'un seul axone.
B : Les deux axones ne sont plus dans le même état : l'axone 2 est excité, Rm_1 est donc plus grand que Rm_2 , Em_1 débite dans Rm_2 à travers $(Ri_1 + Ri_2)$. Le facteur de court-circuit est plus petit qu'en A (autres explications dans le texte).

1er cas (fig. 6A) - Les deux axones sont dans le même état (repos ou activité) et, à l'instant de la mesure, les valeurs de Em_1 et Em_2 sont égales; les batteries sont en opposition et Em_1 par exemple, ne débite pas dans Rm_2 à travers $Ri_1 + Ri_2$. La d.d.p. mesurée entre A et B est donc égale au potentiel de membrane d'un seul axone, atténuée par le facteur de court-circuit précédemment défini.

2ème cas (fig. 6B) - L'un des axones (1) est au repos, l'autre (2) est excité. Dans ce cas, Rm_1 est plus grand que Rm_2 et Em_1 est très différent de Em_2. La d.d.p. mesurée est fonction de Em_1-Em_2 mais on voit aussi que l'une des batteries (Em_1) débite dans la résistance interne de l'autre (Rm_2) à travers les résistances série Ri_1+ Ri_2. Tout se passe donc comme si, pour un axone considéré (1 par exemple), la résistance de membrane (Rm_2) et la résistance longitudinale interne (Ri_2) de l'autre devenaient un élément de la résistance externe dans laquelle sa batterie de membrane (Em_1) débite.

Dans ce cas, le facteur de court-circuit Re /Re+Ri est plus petit que dans le premier cas puisque Re a virtuellement diminué.

Ceci démontre finalement que sans faire intervenir les variations de la résistance de membrane, le facteur de court-circuit n'est pas constant si tous les axones sont au repos et lorsqu'une partie d'entre-eux seulement est en activité. Il est clair que si les conditions expérimentales sont telles que la variation de Rm n'est pas négligeable devant Ri, le facteur de court-circuit varie encore plus fortement, y compris dans le cas ou tous les axones passent de l'état de repos à l'état d'activité. Nous nous proposons d'évaluer ci-après l'importance de la variation du facteur court-circuit dans le cas où tous les axones sont au repos et lorsque le contingent myélinisé seul (50% des axones contenus dans le nerf) est excitée. Ces considérations ont une certaine importance pratique car ces conditions expérimentales sont précisément celles dans lesquelles nous avons presque toujours travaillé. Par ailleurs, il est

important de connaître approximativement la contribution relative des fibres amyéliniques et myélinisées à la valeur globale du "potentiel de membrane" mesuré sur le nerf entier par la technique du double espace saccharose.

Faute de données précises, les simplifications suivantes seront faites :

a/ - on admet que les amplitudes des potentiels de repos et d'action sont les mêmes pour les axones amyéliniques que pour les axones myélinisés.

b/ - on suppose que la variation de résistance de membrane (Δ Rm), lorsqu'un axone passe du repos à l'activité, est négligeable devant sa résistance longitudinale interne (Ri).

c/ - on évalue le diamètre moyen des axones myélinisés à 20 fois celui des fibres amyéliniques.

d/ - les deux catégories d'axone sont considérées comme des cylindres de section constante et l'on admet que la résistivité de l'axoplasme est la même pour les deux types de fibres.

e/ - le nombre de fibres amyéliniques est supposé égal à celui des fibres myélinisées ce qui permet de simplifier le schéma électrique équivalent de la préparation et de le réduire à deux axones associés en parallèle (fig. 6).

f/ - on admet que le facteur de court-circuit est de 0,9 ce qui revient à dire que la résistance interne équivalente du tronc nerveux (Ri) est telle que Re = 9Ri.

Partant de ces simplifications, que nous croyons raisonnables, il apparaît que la résistance longitudinale interne équivalente des axones amyéliniques est 400 fois plus élevée que celle des axones myélinisés. En d'autre termes, la conductance longitudinale interne (1/Ri) des fibres myélinisées représentent 400/401 de la conductance interne globale du faisceau considéré...

On notera que si les fibres amyéliniques peuvent constituer un shunt parfaitement négligeable pour les fibres

myélinisées, l'inverse est très loin d'être vrai.

Supposant, par simplification, que les shunts réciproques des deux catégories de fibres sont négligeables lorsque la totalité de la préparation est au repos et admettant, par conséquent, que la résistance externe Re est commune aux deux catégories de fibres, un calcul simple montre que le facteur de court-circuit est de 0,9 pour les fibres myélinisées alors qu'il est de 0,022 pour les axones amyéliniques.

Ceci revient à dire que les fibres amyéliniques contribuent à raison de 2,5% environ au potentiel de repos global de la préparation. Si les fibres myélinisées seules sont excitées, la batterie de repos des fibres amyéliniques participera pour beaucoup moins de 2,5% au potentiel de membrane global puisque les fibres myélinisées actives augmenteront encore le shunt extérieur des fibres amyéliniques.

Dans ces conditions, et bien que sur le plan numérique le contingent amyélinique de la préparation soit aussi important que le contingent myélinisé, il apparaît que le nerf sciatique, en ce qui concerne ses propriétés électriques, peut être considéré comme un nerf myélinisé. Nous considèrerons du même coup le facteur de court-circuit comme constant dès lors que les fibres myélinisées seront toutes excitées ou au repos.

Stimulation sélective du contingent myélinisé.

La figure 5 représente le schéma de principe du montage utilisé dans la technique du double espace saccharose. La mesure de potentiel est faite entre l'électrode centrale (E_2) plongeant dans le Ringer et l'électrode de droite (E_1) plongeant dans le KCl. Entre ces deux électrodes, Re est élevée par la circulation continue de saccharose.

Le courant de stimulation est appliqué entre l'électrode centrale (E_2) et l'électrode de gauche (E_3) de part et d'autre d'un deuxième espace saccharose au niveau duquel la

résistance externe est élevée aussi. Dans ces conditions, la quasi-totalité du courant délivré par le stimulateur traverse les surfaces de membranes cellulaires comprises dans le compartiment central. Ce compartiment étant étroit, on peut considérer que la densité de courant traversant la membrane est uniforme; de plus, les batteries de membrane comprises dans le compartiment central ne débitent pas dans d'autres régions des axones. On peut donc admettre que la stimulation est de type "focal".

Il découle de ces considérations que le potentiel de membrane et ses variations sont mesurés au niveau de la cathode de stimulation de sorte que le potentiel d'action composé enregistré aura un décours homogène quels que soient les groupes de fibres recrûtés. Il n'est donc pas possible, dans ces conditions, de savoir quelle catégorie de fibres est excitée comme il serait possible de le savoir d'après le décours temporel d'un potentiel d'action global enregistré à distance du point de stimulation (ERLANGER et GASSER, 1937).

On a vu dans les pages précédentes que si tous les axones du nerf sciatique sont stimulés, 97,5% au moins de l'amplitude totale du potentiel d'action composé doivent être attribués aux fibres myélinisées et seulement 2,5% aux axones amyéliniques.

En toute rigueur, et dans nos conditions expérimentales, une stimulation sélective du contingent myélinisé consisterait à exciter la totalité des axones du nerf dans un premier temps et à évaluer l'amplitude correspondante du potentiel d'action. Ensuite, l'intensité du courant de stimulation devrait être réduite de façon que l'amplitude du potentiel d'action global diminue de 2,5% environ. Il est clair que ces manipulations seraient hasardeuses ne serait-ce qu'en raison des difficultés que l'on éprouverait à apprécier de telles variations.

En fait, un raisonnement simple permet de montrer que le seuil d'excitation des fibres amyéliniques est obligatoirement très différent de celui des fibres myélinisées.

Si l'on tient compte en effet de la très grande

différence de résistance longitudinale interne entre les fibres myélinisées et amyéliniques, on peut considérer que pour une intensité donnée, la quasi-totalité du courant traverse les fibres myélinisées. Si cette intensité est ajustée à une valeur juste suffisante pour que les axones myélinisés soient excités, le 1/400 de ce courant devrait en principe (voir pages précédentes) traverser le contingent amyélinique. Il est hautement improbable qu'un tel courant soit suffisant pour mettre en activité les axones amyéliniques, en particulier si l'on considère la très grande inégalité des densités de courant traversant les membranes nodales et les membranes des axones amyéliniques dans ces conditions expérimentales.

Supposons en effet, par simplification, que les propriétés (résistance et capacité spécifiques etc...) des membranes axonales des deux catégories de fibres soient les mêmes et considérons les surfaces de membrane de ces fibres dans le compartiment central alimenté en Ringer (fig. 5). Si l'on donne une largeur de 1,5 mm à ce compartiment (on verra plus loin que telle était la largeur du compartiment central dans le dispositif que nous avons utilisé), il apparaît qu'un seul noeud de Ranvier par fibre myélinisée (soit en moyenne une surface de 10 μm^2) est traversé par le courant de stimulation.

Pour une fibre amyélinique de 0,5 µm de diamètre, la surface de membrane traversée par le courant serait de 2 355 μm^2 soit environ une surface 200 fois plus grande que celle de la fibre myélinisée.

Il s'en suit que même si la résistance longitudinale des fibres amyéliniques était la même que celle des axones myélinisés (ce qui est absurde), la densité de courant traversant la membrane serait 200 fois plus faible pour la première catégorie d'axones que pour la seconde.

Il apparaît donc que deux raisons au moins sont largement suffisantes pour que les fibres myélinisées puissent être stimulées sélectivement en ajustant grossièrement l'intensité du courant d'excitation à une valeur très inférieure à

celle qui permettrait de recruter le contingent amyélinique du nerf sciatique.

En pratique, tout se passe comme si l'amplitude maximum apparente du potentiel d'action correspondait à l'activation du contingent myélinisé seul. Il faudrait une intensité supérieure de plusieurs ordres de grandeur pour recruter le contingent amyélinique et l'on peut se demander, à ce moment là, comment les fibres myélinisées supporteraient de telles intensités sans dommages irréversibles.

On peut donc admettre en définitive qu'il suffit , pour exciter les axones myélinisés seuls, d'appliquer à la préparation un courant d'excitation d'intensité suffisante pour obtenir un potentiel d'action d'amplitude "maximum".

C'est ainsi que nous avons toujours procédé et l'on verra dans la suite de ce mémoire qu'il y a tout lieu de penser que les fibres amyéliniques n'ont jamais été excitées dans ces conditions.

Dispositif expérimental.

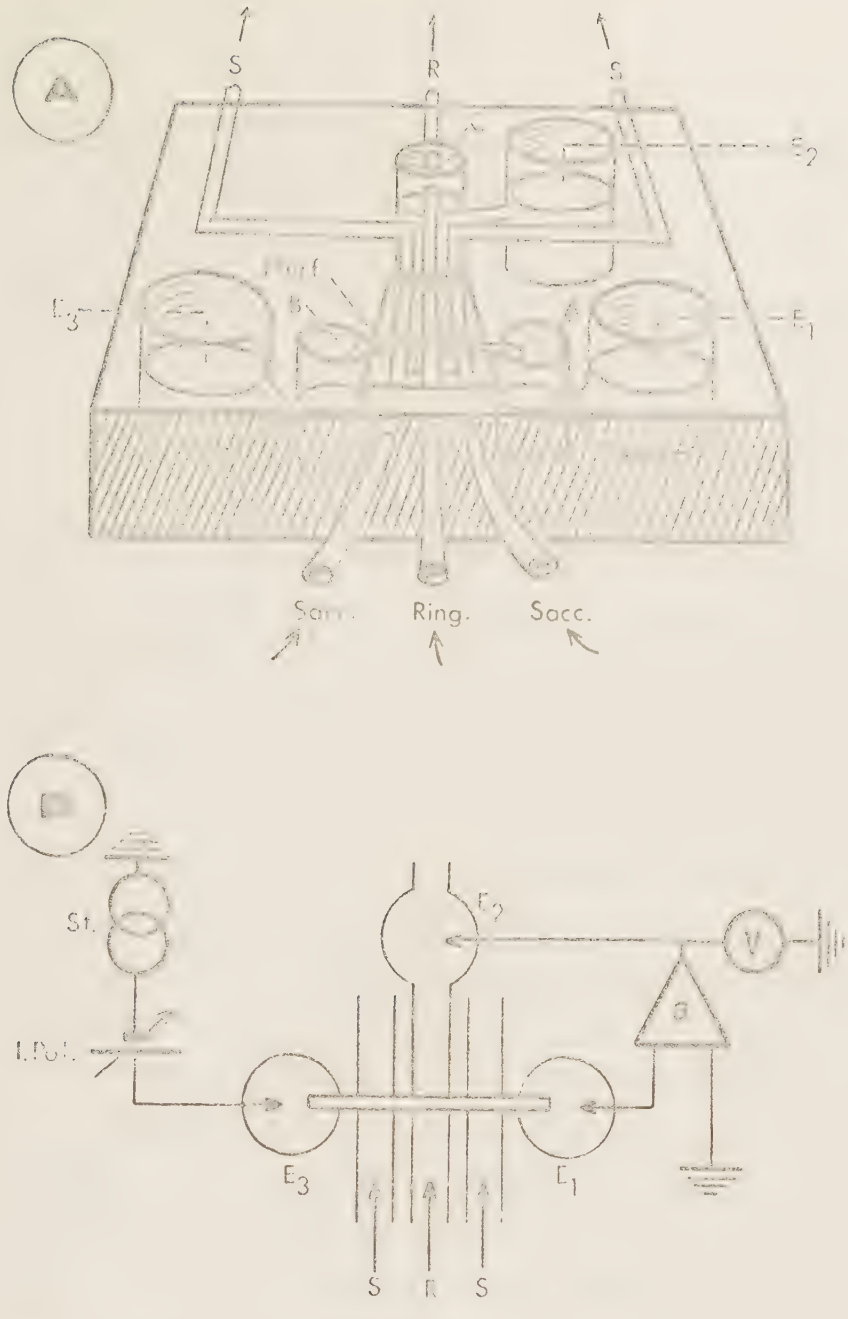
Après le prélèvement du nerf sur l'animal, le perinèvre du tronc nerveux était retiré, de proche en proche, à l'aide de fines aiguilles.

Le faisceau ainsi obtenu était disposé dans une chambre en plexiglas représentée dans la figure 7A.

Cette chambre comporte trois tubulures parallèles en matière plastique souple (diamètre 1,8 mm) espacées les unes des autres de 2,3 mm (distances entre-axes).

Une encoche centrale, étroite (0,8 mm), un peu moins profonde que le rayon des tubulures, permet de déposer le faisceau nerveux transversalement et d'assurer le lavage continu de trois segments de nerf par les solutions.

La tubulure médiane est traversée par la solution



- Figure 7 -

A : Représentation schématique de la chambre à expériences utilisée. Trois tubulures permettent un écoulement continu de Ringer et de saccharose. Le faisceau est représenté dans les encoches médianes qui coupent chacune des 3 tubulures; ses extrémités plongent dans 2 récipients A et B remplis de KCl isotonique. Chacun des récipients est relié à une électrode au calomel (E_3 et E_1) par un pont de gélose saturée de KCl. L'électrode E_2 est reliée de la même façon au récipient C dans lequel circule le Ringer ou la solution test qui lave la préparation .

B : Circuit de stimulation et d'enregistrement.

- Le stimulateur (St) est placé en série avec une pile de polarisation variable (I-Pol). La préparation est stimulée entre E_3 et la terre.

- L'enregistrement se fait par l'électrode E_1 reliée à l'entrée de l'amplificateur a dont la sortie est réunie à l'électrode E_2 (contre réaction négative) L'enregistreur (V) se trouve entre E_2 (face externe de la membrane) et le potentiel de la terre (potentiel de référence auquel est maintenue la face interne de la membrane).

de Ringer (ou toute autre solution test), les deux tubulures latérales, par des solutions de saccharose ou mannitol isotonique.

Les deux extrémités du nerf plongent dans deux petits récipients, A et B, remplis d'une solution isotonique de KCl.

Les solutions entrent par la face avant de l'appareil et le quittent par la face arrière; leur débit est ajusté de telle façon que les segments de nerf se trouvant dans les tubulures, au niveau des encoches, soient toujours recouverts de solution et ceci, à un niveau constant pendant toute la durée de l'expérience. Un réglage du niveau de sortie, non figuré sur le dessin, permet d'éviter le débordement des solutions hors des encoches.

Entre chaque tubulure, un petit espace de 0,5 mm évite une communication entre les solutions. Le faisceau nerveux est exposé à l'air dans ces espaces mais la diffusion des solutions entre les axones évite un déssèchement et une instabilité des potentiels de jonction liquide-liquide.

Les petits récipients A et B d'une part et le récipient C (traversé par le Ringer) d'autre part, communiquent avec des godets plus larges (E_1, E_3 et E_2 respectivement) par l'intermédiaire d'un gel d'agar-agar saturé en KCl.

Ces godets sont en fait des demi-cellules au calomel inversées (le calomel repose sur la gélose; le mercure en surface, recouvre le calomel). Ces godets ont un diamètre relativement grand (20 mm) afin d'accroître les surfaces d'échange KCl-HgCl et HgCl-Hg. Bien que traversées par des courants ces électrodes conservaient une remarquable stabilité, en cours d'expérience. En outre, l'électrolyte (KCl) qui était en contact avec le calomel conservait une composition constante indépendante de la nature des solutions en contact avec la préparation, au niveau de E_2 en particulier. Un fil de platine traversant un bouchon étanche plonge dans le mercure et raccorde les électrodes aux autres éléments du montage.

La figure 7B représente le schéma des circuits d'enregistrement et de stimulation.

L'électrode d'enregistrement E_1 est raccordée à l'entrée électrométrique d'un amplificateur opérationnel a. La sortie de cet amplificateur est réunie à l'électrode centrale E_2, ce qui correspond à une contre-réaction négative dont l'effet est de maintenir la polarisation de la face interne des membranes axonales à une valeur égale au potentiel de référence du système soit : le potentiel de la terre.

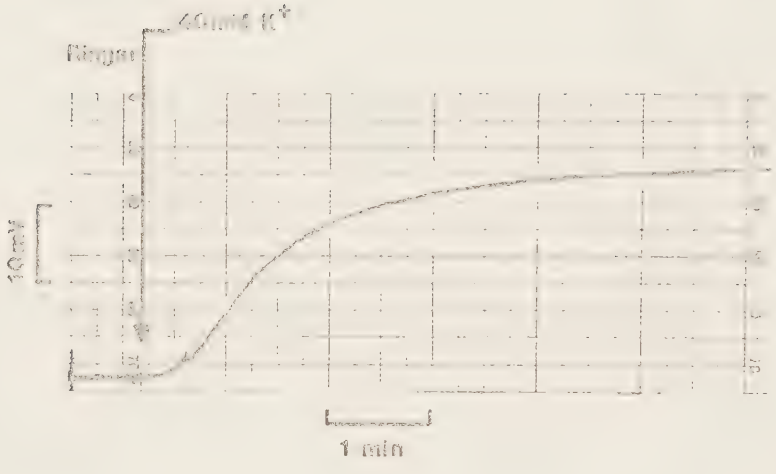
Un générateur d'impulsions (stimulateur Equipement Industriel type ST. IIB) est associé en série avec une batterie de polarisation variable (I-Pol). Ces deux générateurs débitent à travers la résistance longitudinale interne des axones et peuvent être considérés comme des générateurs de courant constant en raison de la valeur élevée de ces résistances.

Le courant qu'ils fournissent est appliqué à la préparation entre l'électrode E_3 et la terre, ce qui revient, virtuellement, à appliquer le courant entre la face externe des membranes axonales (électrode E_3) et leur face interne (potentiel de la terre).

De même, l'appareil de mesure V, oscilloscope ou enregistreur potentiométrique à plume, se trouve virtuellement inséré entre le milieu intra-cellulaire et la face externe de la membrane (électrode E_2), dans le compartiment central traversé par les solutions physiologiques.

Tout se passe donc comme si l'on mesurait, au facteur de court-circuit près, le potentiel de membrane des axones et ses variations à travers une électrode intra-cellulaire de résistance Ri shuntée par une résistance extra-cellulaire.

On notera que, en raison de la lenteur et de la faible amplitude des phénomènes que nous nous proposions d'observer (hyperpolarisation post-tétanique), un soin particulier a été apporté à la stabilité du dispositif expérimental plutôt qu'à ses performances en vitesse de réponse (bande passante).



- Figure 8 -

Enregistrement du potentiel de membrane en fonction du temps lorsqu'on applique au faisceau une solution contenant 40 mM de potassium.
Noter que la dépolarisation maximum est atteinte en cinq minutes environ.

Comme on le verra dans le chapitre résultats, les hyperpolarisations post-tétaniques ont été enregistrées sur un scripteur potentiométrique (BECKMAN) à grand gain, stabilisé par chopper électronique. Le "temps de montée" de cet enregistreur était suffisamment court pour que la phase initiale rapide des post-hyperpolarisations ne soit pas atténuée de plus de 5% par rapport à l'amplitude réelle mesurée simultanément sur l'oscilloscope. L'oscilloscope (Tektronix 502A) permettait de contrôler en permanence et simultanément l'amplitude du potentiel d'action global d'une part et la durée et l'amplitude des impulsions de stimulation d'autre part.

La durée de ces impulsions n'excédait jamais 20 microsecondes.

Limites de la technique.

L'amplitude maximum des potentiels d'action composés enregistrés par cette version du double espace saccharose était toujours comprise entre 65 et 85 mV (exceptionnellement 90 mV). Dans la grande majorité des cas, elle était voisine de 75 mV ce qui, par comparaison avec l'amplitude du potentiel d'action de la fibre myélinisée isolée (120 mV), correspond à un facteur de court circuit de l'ordre de 0,60.

Ce coefficient, on le notera, est nettement inférieur à celui qu'ont pu obtenir STAMPFLI ou SCHMIDT. La raison est très probablement que le nerf sciatique que nous avons utilisé est une préparation beaucoup plus massive et riche en endonèvre que le nerf tibial utilisé par les auteurs. Il s'en suit que la diffusion des solutions de faible conductivité est beaucoup plus lente que dans le nerf tibial.

La vitesse de diffusion a été estimée (fig. 8) d'après la vitesse de dépolarisation produite par une solution de KCl 40 mM . On voit que la dépolarisation maximum est atteinte en 5 minutes environ alors que le même effet pouvait être obtenu par SCHMIDT, sur le nerf tibial, en une minute environ.

Le très grand avantage de la méthode était cependant la facilité d'installation de la préparation dans la chambre à expériences. En outre, il était intéressant pour nous de pouvoir comparer nos résultats à certaines données obtenues par différents auteurs sur la même préparation. On notera que nous avons occasionnellement, et dans un autre appareil, utilisé le nerf tibial afin d'évaluer l'influence de la variation de l'espace extra-cellulaire sur l'hyperpolarisation post-tétanique. Les phénomènes enregistrés, aux constantes de temps près, étaient les mêmes que sur le nerf sciatique.

Préparation des solutions.

Les solutions dérivaient du Ringer ordinaire auquel 2 mM de $MgCl_2$ ont toujours été ajoutées. La composition de cette solution de référence était donc la suivante :

NaCl: 112 mM; KCl: 2,5 mM; $CaHCO_3$: 2,4 mM; $CaCl_2$: 1,8 mM et $MgCl_2$: 2 mM.

Dans certaines expériences, la composition ionique de cette solution a été modifiée, en général par substitution équimolaire de sels monovalents au NaCl.

Nous avons ainsi utilisé deux solutions enrichies en KCl (40 mM et 117 mM), une solution dite "Ringer lithium" contenant 112 mM de LiCl à la place du NaCl. Dans quelques expériences, la concentration en NaCl a été réduite de 50%; dans ce cas, la pression osmotique a été rétablie à sa valeur normale par adjonction de saccharose à raison de 34,5 g/l.

La composition anionique du Ringer a été aussi modifiée en substituant à la totalité du NaCl : soit 112 mM de benzène-sulfonate de sodium, soit la même quantité d'isethionate de Na.

Nous avons fait appel, dans de nombreuses expériences, à des inhibiteurs du métabolisme (2-4 dinitrophénol à 0,5 mM) ou du transport actif (ouabaïne à 1 mM). Ces poisons

étaient ajoutés au Ringer ordinaire.

Enfin, des inhibiteurs des perméabiltés spécifiques (tétra-éthyl-ammonium à 5 mM ou tetrodotoxine 10^{-6} g /ml) ont été ajoutés aussi au Ringer ordinaire dans certains cas.

Les solutions de faible conductivité ont été dans la plupart des cas des solutions isotoniques de mannitol (37g /l) ce sucre étant en général beaucoup plus pur et donc moins conducteur que le saccharose.

C H A P I T R E IV

ANALYSE EXPERIMENTALE ET RESULTATS.

Notre travail a consisté, dans un premier temps, à analyser l'hyperpolarisation post-tétanique du nerf sciatique dans des conditions physiologiques normales et à essayer de déterminer les facteurs dont elle dépend.

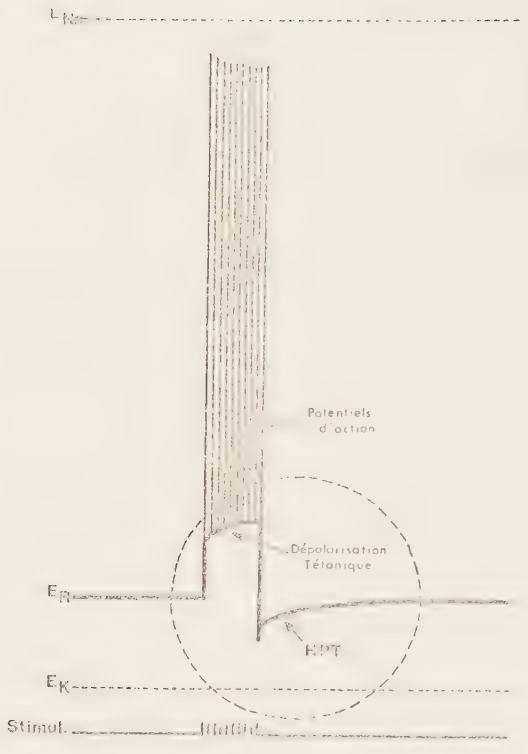
Nous rappellerons que l'hyperpolarisation post-tétanique (HPT) est une phase de surpolarisation transitoire de la membrane axonale qui survient après une stimulation répétitive, en général imposée à cadence élevée (tétanos).

Elle consiste donc en un accroissement momentané de la négativité de la face interne de la membrane excitable par rapport à sa valeur normale au niveau du potentiel de repos.

La figure 9 représente de façon schématique les différents évènements survenant pendant et après un tétanos du nerf sciatique.

Avant stimulation, le potentiel de membrane présente une valeur stable (E_R = potentiel de repos), assez proche du potentiel d'équilibre des ions potassium (E_K). Dès que les axones sont stimulés par des impulsions de courant dépolarisant, les potentiels d'action se développent successivement et l'on observe, si la cadence de stimulation dépasse une vingtaine de cycles par seconde (Hz), que la membrane reste notablement dépolarisée entre chaque potentiel d'action "dépolarisation tétanique". A la fin du tétanos, la membrane s'hyperpolarise brusquement puis revient à son niveau de polarisation de repos en un temps de l'ordre de la minute (hyperpolarisation post-tétanique).

La figure 10 représente un enregistrement réel, typique, obtenu à l'aide du scripteur potentiométrique Beckman, pendant et après un tétanos de 30 secondes à 150 Hz.



- Figure 9 -

Représentation schématique des variations du potentiel de membrane (ER) pendant et après une stimulation tétanique. A la fin du tétanos se développe une hyperpolarisation post-tétanique (HPT). Noter que ER tend vers E_{Na} pendant la stimulation et vers E_K pendant l'HPT.

- Figure 10 -

Enregistrement réel sur scripteur Beckman des variations décrites dans la légende de la figure 9. La préparation est stimulée 30 sec à 150 Hz. L'HPT qui fait suite au tétanos mesure 4,6 mV et dure 3 minutes. Au cours du tétanos seule la dépolarisation tétanique est enregistrée.

On voit :

- le niveau du potentiel de repos avant excitation.

- la dépolarisation tétanique survenant pendant la salve de potentiels d'action (ces derniers ne sont pas enregistrés car leur durée est trop brève eu égard à la bande passante du scripteur).

- la post-hyperpolarisation survenant dès la fin du tétanos.

On notera que l'hyperpolarisation se décompose en deux phases, l'une initiale rapide et l'autre, beaucoup plus lente.

L'amplitude de l'HPT, mesurée par rapport au niveau du potentiel de repos, dans le cas de cette expérience, est de 4,6 mV. Compte-tenu de la valeur du facteur de court-circuit (0,60), l' HPT enregistrée correspond en réalité à : 4,6/0,6 = 7,6 mV.

On voit qu'il s'agit d'un phénomène de faible amplitude et de cinétique lente.

La grande constante de temps du phénomène suggère fortement que cette hyperpolarisation aît quelque rapport avec un transport actif. On ne peut cependant s'empêcher d'imaginer aussi qu'elle puisse correspondre à un accroissement de perméabilité au potassium puisque, la figure 9 l'indique à dessein, le potentiel de membrane se rapproche momentanément du poten - tiel d'équilibre du potassium.

Il est clair par ailleurs que cette hyperpolarisation est liée au tétanos qui la précède car aucune surpolarisation transitoire n'apparaît après un potentiel d'action isolé.

Nous avons donc été amenée, dans nos premières expériences, à étudier les variations d'amplitude de l'HPT en fonction de la durée et de la fréquence de l'excitation tétanique conditionnante.

- Figure 11 -

Enregistrement des HPT obtenues par stimulation du nerf sciatique par des salves dont la durée variait de 0,5 à 64 sec.
On constate une augmentation nette à la fois de l'amplitude et de la durée de l'HPT avec l'augmentation de durée de la salve tétanique conditionnante. Expérience du 11.6.71.

I - VARIATIONS D'AMPLITUDE DE L'HPT EN FONCTION DES PARAMETRES DE STIMULATIONS.

I.1 - L'amplitude de l'HPT dépend de la durée du tétanos conditionnant.

Cette série d'expériences a été faite afin de déterminer l'influence de la durée du tétanos sur l'amplitude de l'HPT, à fréquence de stimulation constante.

Protocole expérimental.

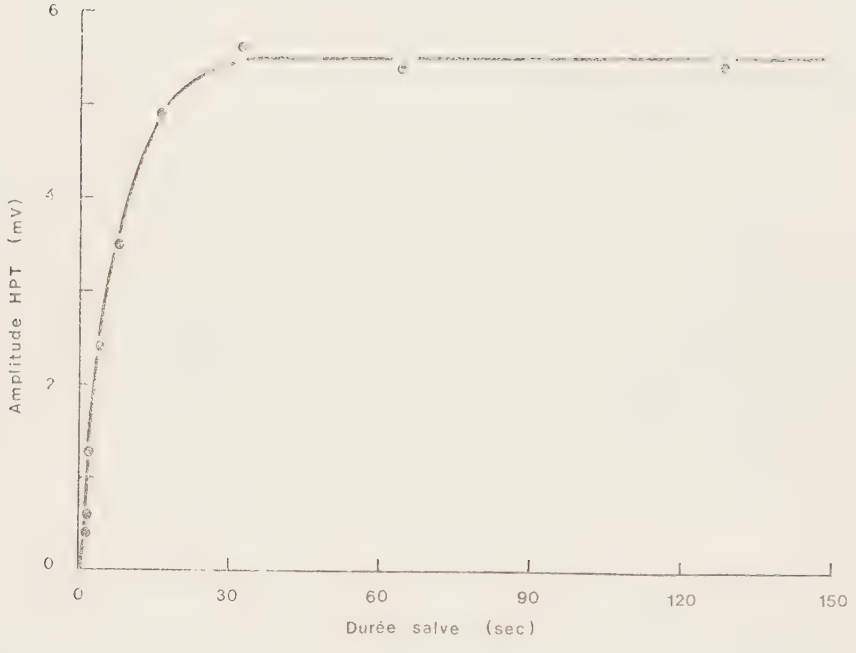
Le nerf était stimulé à une fréquence relativement élevée (150Hz). L'intensité de stimulation était ajustée à une valeur juste suffisante pour que l'amplitude du potentiel d'action (contrôlée sur l'oscilloscope) soit maximum. On vérifiait en outre que pour cette cadence de stimulation, l'amplitude du potentiel d'action global restait maximale à chaque impulsion pendant toute la durée de la salve.

La durée des salves, jusqu'à 2 secondes, était automatiquement réglée par le stimulateur; pour des durées supérieures, le stimulateur était pré-réglé en régime relaxé à une fréquence de 150 Hz mais un interrupteur, commandé manuellement, permettait d'établir et d'interrompre à volonté l'excitation pendant des périodes chronométrées.

Résultats.

La figure 11 représente un enregistrement obtenu sur le scripteur pour des salves de différentes durées comprises entre 0,5 et 64 secondes. Les salves, on le notera, se succédaient à des intervalles de temps suffisants pour que la polarisation normale de repos soit retrouvée après l'HPT.

Il apparaît clairement que l'amplitude maximum de



- Figure 12 -

Représentation graphique de la variation d'amplitude de l'HPT en fonction de la durée de la salve conditionnante (à fréquence de stimulation constante ici 150 Hz).
L'amplitude de l'HPT croît rapidement avec la durée de la salve puis se stabilise. L'amplitude maximum est atteinte ici pour une durée de salve de l'ordre de 30 sec.
Moyennes de 8 expériences.

l'HPT augmente avec la durée de la stimulation tétanique.

La figure 12 est une représentation graphique de la variation d'amplitude de l'HPT en fonction de la durée du tétanos, à fréquence constante. On voit qu'à partir d'une durée d'une trentaine de secondes, l'HPT atteint une amplitude maximum, ce qui traduit le développement d'un processus cumulatif et très certainement lié au nombre de potentiels d'action produits par le tronc nerveux.

On notera que RANG et RITCHIE (1968), analysant l'HPT du nerf vague de Mammifère, signalent que son amplitude n'augmente plus au delà d'une durée de tétanos de 5 secondes environ lorsque la fréquence d'excitation est de 30 Hz.

I. 2 - L'amplitude de l'HPT dépend de la fréquence de stimulation.

Compte-tenu des réflexions que peuvent inspirer les résultats précédents, on était en droit d'attendre une variation d'amplitude de l'HPT avec la fréquence d'excitation tétanique.

Nous avons donc imposé à la préparation des tétanos de durée constante (15 secondes) et nous avons fait varier la fréquence de 30 à 300 Hz. Cette dernière valeur, il convient de le noter, correspond à une période $t = 1/300$ sec = 3,3 msec, inférieure à la durée de la période réfractaire "relative" des fibres nerveuses myélinisées (5 à 10 msec selon la température - voir LÜTTGAU, 1956). Il s'en suit qu'à partir d'une fréquence supérieure à 150 Hz environ, l'amplitude d'un potentiel d'action sur deux (phénomène "d'alternance") au cours du tétanos est inférieure à l'amplitude maximum, même si l'intensité du courant d'excitation est volontairement augmentée. Cette réduction d'amplitude est d'autant plus marquée que la fréquence de stimulation est élevée.

- Figure 13 -

Représentation graphique de l'amplitude de l'HPT en fonction de la fréquence de la salve conditionnante (durée de salve constante, ici 15 sec). On voit que la courbe des amplitudes présente un maximum pour une fréquence de 150 à 200 Hz. Moyenne de 6 expériences

Résultats.

Les résultats de ces expériences sont présentés dans la figure 13. On voit que l'amplitude maximum de l'HPT (moyenne de 8 expériences) augmente avec la fréquence de la salve comme on l'attendait, mais il est intéressant de noter que cette amplitude atteint une valeur maximum vers 150 Hz et décroît progressivement avec les fréquences supérieures.

Le fait que l'amplitude commence à diminuer à partir de fréquences pour lesquelles apparaît le phénomène d'alternance suggère très fortement que l'HPT soit liée, directement ou indirectement , à des variations de perméabilité au sodium pendant le potentiel d'action et en tous cas, à l'amplitude de ce dernier.

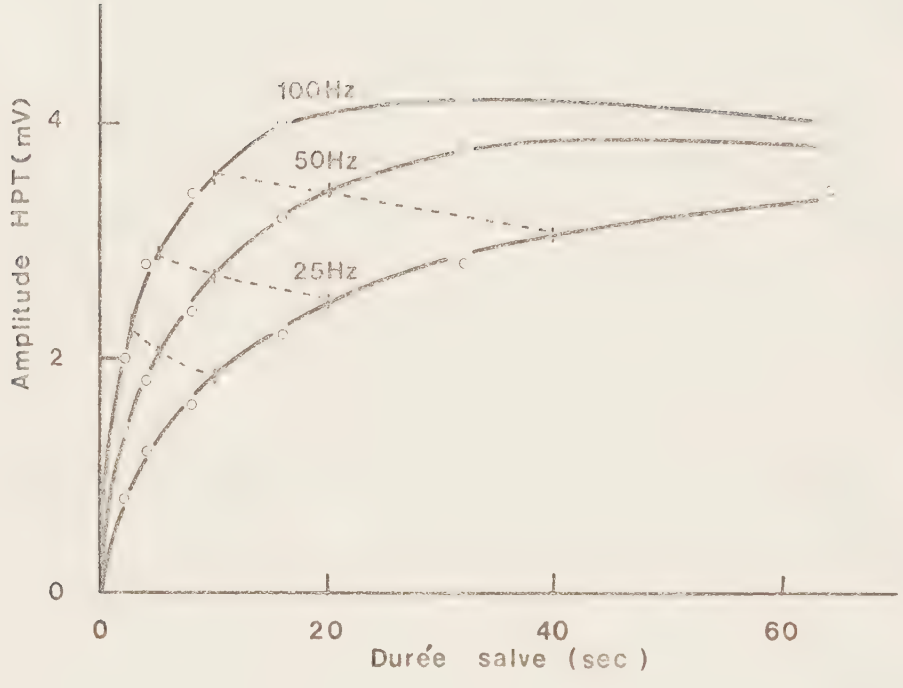
I.3 - Variation d'amplitude de l'HPT à fréquence et durée de stimulation tétanique variables.

Cette série d'expériences visait à analyser la variation de l'amplitude de l'HPT en fonction de la durée des salves et ceci, pour différentes fréquences.

Le protocole expérimental correspondait à la combinaison des deux précédents et les résultats sont rapportés par la figure 14.

Ce graphique montre que l'amplitude de l'HPT tend vers une valeur maximum au fur et à mesure qu'augmentent la durée et la fréquence du tétanos conditionnant (noter la convergence des courbes vers le droite du graphique). Il est important toutefois de noter que cette amplitude maximum est atteinte pour des durées de salves d'autant plus brèves que la fréquence est élevée.

Tout se passe donc, d'un point de vue qualitatif, comme si le niveau de saturation était atteint dès qu'un



- Figure 14 -

Variation d'amplitude de l'HPT en fonction de la durée de la salve conditionnante, pour différentes fréquences de salve (25-50-100 Hz). Ces courbes montrent que l'amplitude maximum est atteinte pour des durées de salve d'autant plus courtes que la fréquence est grande. Les trois lignes interrompues réprésentent la variation d'amplitude de l'HPT produite après 250, 500, 1 000 PA pour les différents fréquences de stimulation. Expérience du 16.7.71.

certain nombre de potentiels d'action a été produit par le nerf.

Il est donc intéressant de considérer l'amplitude de l'HPT résultant d'un même nombre de potentiels d'action produits par le nerf à des fréquences et des durées différentes.

Ainsi pour 500 potentiels d'action produits :

- en 20 secondes à une fréquence de 25 Hz,
- en 10 secondes à une fréquence de 50 Hz,
- en 5 secondes à une fréquence de 100 Hz

les amplitudes de l'HPT sont respectivement de 2,4 - 2,7 et 2,9 mV.

Le fait que cette amplitude ne soit pas rigoureusement constante dans ces conditions indique qu'elle ne dépend pas seulement du nombre de potentiels d'action produits par le nerf, mais aussi de leur fréquence (puisque cette amplitude augmente légèrement mais régulièrement si l'intervalle entre potentiels d'actions successifs diminue). On notera toutefois que la variation est faible.

Il est donc très tentant, sur la base de ces considérations et de l'examen du graphique de la figure 13, de songer à un processus d'accumulation dans un compartiment non-clos, dans lequel les entrées, aux fréquences de stimulation considérées, seraient plus importantes que les fuites par unité de temps. Cette idée peut être d'autant plus facilement soutenue que l'hyperpolarisation post-tétanique n'est pratiquement plus décelable à des fréquences de stimulation inférieures à une quinzaine de Hertz.

Ces premiers résultats nous inspirent dès à présent quelques réflexions que nous discuterons ci-après.

Interprétation des résultats.

Bien qu'il ne soit pas possible d'exclure, sur la seule base de ces données expérimentales, une contribution de

la variation de P_K à la génèse de l'HPT, il semble que l'on puisse dire dès maintenant qu'elle ne peut en être la seule cause voir même la cause primaire.

En effet, si l'HPT résultait seulement d'un accroissement cumulatif de P_K, cela signifierait que différentes valeurs de la perméabilité au potassium sont atteintes du fait du cumul des dépolarisations brèves et successives que sont les potentiels d'action au cours d'un tétanos durable. Il faudrait donc admettre - ce qui n'est certes pas exclu - qu'une perméabilité au potassium à constante de temps très grande peut se développer dans la membrane axonale. Un tel changement de perméabilité n'a jamais été décrit sur la fibre myélinisée et il serait étonnant, il faut le reconnaître, que ce phénomène ait échappé à l'analyse expérimentale jusqu'à ce jour, alors même que FRANKENHAEUSER (1962), VOGEL et SCHWARTZ (1971) et BERGMAN (1970) ont toujours observé, dans des conditions de voltage-clamp, une variation inverse de la P_K en fonction du temps, à savoir : une inactivation de la perméabilité au potassium d'autant plus prononcée (mais incomplète) que la dépolarisation continue (ou rythmique) est durable.

En admettant cependant que pour une raison ou une autre la perméabilité augmente, il ne serait pas surprenant que l'amplitude de la HPT augmente comme nous l'avons observé, avec la fréquence et la durée de la stimulation tétanique.

Dans ce cas toutefois, les diagrammes d'amplitude de l'HPT en fonction de la durée du tétanos devraient être très différents de ceux que nous avons obtenus et présentés dans la figure 14. On attendrait en effet que, pour des fréquences différentes, les courbes présentent différents niveaux de saturation (correspondant respectivement à différents niveaux de perméabilité stationnaire) qui seraient d'ailleurs atteints après des temps approximativement identiques.

Tels ne sont pas ces diagrammes puisque les courbes convergent vers un niveau maximum.

On s'explique mal, dans ces conditions, comment la perméabilité au potassium tendrait vers une valeur maximum et identique pour des fréquences d'excitation différentes.

Il semble donc peu probable que les données apportées par la figure 14 puissent être expliquées par un accroissement post-tétanique de la perméabilité au potassium. On est donc conduit à envisager que la génèse de l'HPT est en grande partie au moins, et indirectement sans doute, liée à une accumulation ionique dans un espace à diffusion restreinte. Cette accumulation dépend, évidemment, du nombre de potentiels d'action produits mais aussi de leur vitesse de succession dans le temps et de leur amplitude probablement.

Deux types d'accumulation peuvent être liées à l'activité rythmique d'une cellule excitable :

a/ - une accumulation de potassium dans l'espace extracellulaire.

b/ - une accumulation de sodium dans l'espace intracellulaire.

Nous analyserons donc ces deux phénomènes primaires dans les termes de deux hypothèses susceptibles de rendre compte de l'hyperpolarisation post-tétanique du nerf sciatique, à savoir:

1/ - l'HPT résulte d'un accroissement de P_K

2/ - l'HPT reflète l'activité d'une pompe Na-K.

Si nous supposons que l'accumulation d'ions K^+ est responsable de la génèse de l'HPT, il est rigoureusement impossible d'admettre que celle-ci résulte d'une augmentation de P_K puisque l'accroissement de $[K]_e$ aboutit à une réduction du potentiel d'équilibre des ions potassium. On devrait donc observer une HPT d'autant moins ample que la durée et la fréquence du tétanos sont grandes. Pour une grande durée, l'HPT devrait céder à une post-dépolarisation.

Par contre, si l'on admet que l'HPT résulte de

l'activation d'une pompe Na-K, on peut concevoir, sur la base des expériences de RANG et RITCHIE (1968) ou de THOMAS (1969), qu'un accroissement de $[K]_e$ active une telle pompe.

Si nous supposons maintenant que l'augmentation de $[Na]_i$ avec la durée et la fréquence des tétanos est à l'origine de l'HPT, il apparaît que la réduction du potentiel d'équilibre du sodium qui résulterait d'une telle accumulation pourrait, à la rigueur, rendre compte d'une hyperpolarisation mais il faudrait pour cela que la membrane soit perméable aux ions Na^+ au niveau du potentiel de repos. On sait qu'il n'en est rien, en particulier à la fin d'un tétanos, et l'on ne voit aucune raison, si l'HPT résultait d'un accroissement de P_K, pour qu'une augmentation de $[Na]_i$ soit la cause de son exaltation. Bien au contraire, puisque BERGMAN (1970) sur la fibre myélinisée, ADELMAN et SENFT (1971) puis BEZANILLA et ARMSTRONG (1972), sur l'axone de Calmar, ont pu montrer que la perméabilité au potassium diminue lorsque la concentration intra-cellulaire en sodium augmente.

Par contre, si l'on suppose que l'HPT reflète l'activation d'une pompe Na-K, il ne fait aucun doute qu'un accroissement de la concentration intra-cellulaire en sodium puisse aboutir à une augmentation de l'activité de cette pompe (HODGKIN et KEYNES, 1956; MULLINS et BRINLEY, 1969; THOMAS, 1969).

Il apparaît donc, au terme de cette tentative d'interprétation de nos premiers résultats, que les présomptions soient fortes pour que l'HPT résulte de l'activation d'une pompe Na-K.

Il nous semble en outre raisonnable de supposer que la cause primaire soit une accumulation ionique et, à ce titre, il est plus probable que celle-ci soit un accroissement de la concentration en sodium dans l'espace intra-cellulaire qu'une augmentation de la concentration en potassium dans l'espace extra-cellulaire.

Les expériences qui suivent ont pour objectif d'éprouver l'hypothèse que nous retenons pour l'instant, à savoir que l'hyperpolarisation post-tétanique du nerf sciatique

reflète l'activité d'une pompe Na-K stimulée par l'accroissement de la concentration intra-cellulaire en ions Na^+.

II - LA CAUSE PRIMAIRE DE L'HPT EST L'ACCUMULATION D'IONS Na^+ DANS L'AXOPLASME DES FIBRES MYELINISEES.

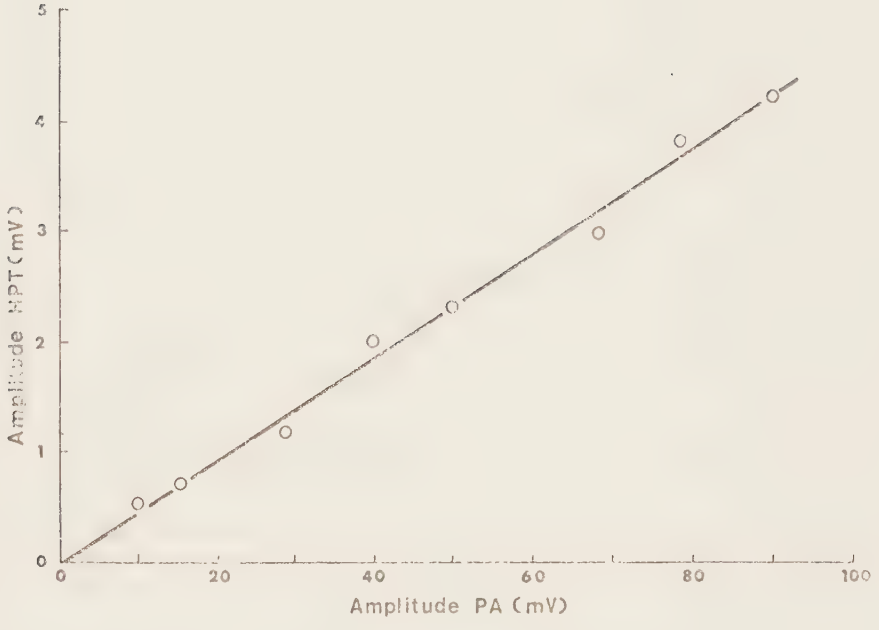
On a déduit d'une précédente analyse (voir chapitre 3) que le potentiel d'action enregistré sur le nerf sciatique à l'aide de la technique du double espace saccharose devait représenter le potentiel d'action composé desfibres myélinisées du tronc nerveux. Si l'on considère admise cette proposition, il importe de savoir si une corrélation étroite peut être mise en évidence entre ces potentiels d'action et l'HPT, en observant toutefois que dans l'affirmative, cette corrélation ne prouverait pas nécessairement que l' HPT soit le résultat d'une variation du potentiel de membrane des axones myélinisés (elle serait hautement probable cependant).

Il se peut en effet, comme nous l'avons déjà envisagé, qu'une pompe Na-K très active sur les fibres amyéliniques soit activée par une élévation de la concentration en potassium dans l'espace extra-cellulaire (c.f. "réponse activée par le potassium " de RANG et RITCHIE, 1968). Cette variation de con - centration pourrait être produite par des fibres myélinisées. Le résultat serait que l'hyperpolarisation post-tétanique correspondrait à un changement de la polarisation membranaire des axones amyéliniques, proportionnellement à un ou plusieurs paramètres exprimant l'activité des fibres myélinisées.

La série d'expériences suivante est une première approche en vue de résoudre ce problème.

II.1 - L'amplitude de l'HPT dépend du nombre de fibres myélinisées excitées pendant le tétanos conditionnant.

Dans ces expériences, l'amplitude du potentiel d'action composé a été portée à différentes valeurs en faisant varier



- Figure 15 -

Variation d'amplitude de l'HPT en fonction de l'amplitude du potentiel d'action au cours du tétanos. La variation d'amplitude du potentiel d'action composé était obtenue en faisant varier l'intensité du courant de stimulation.

l'intensité des impulsions de stimulation. Ceci revenait à recruter un nombre plus ou moins élevé d'axones, (ceux dont le seuil d'excitation est le plus bas étant les axones myélinisés de gros diamètre).

Protocole expérimental.

La durée et la fréquence des tétanos sont restées constantes dans toutes ces expériences et respectivement égales à 15 secondes et 150 Hz.

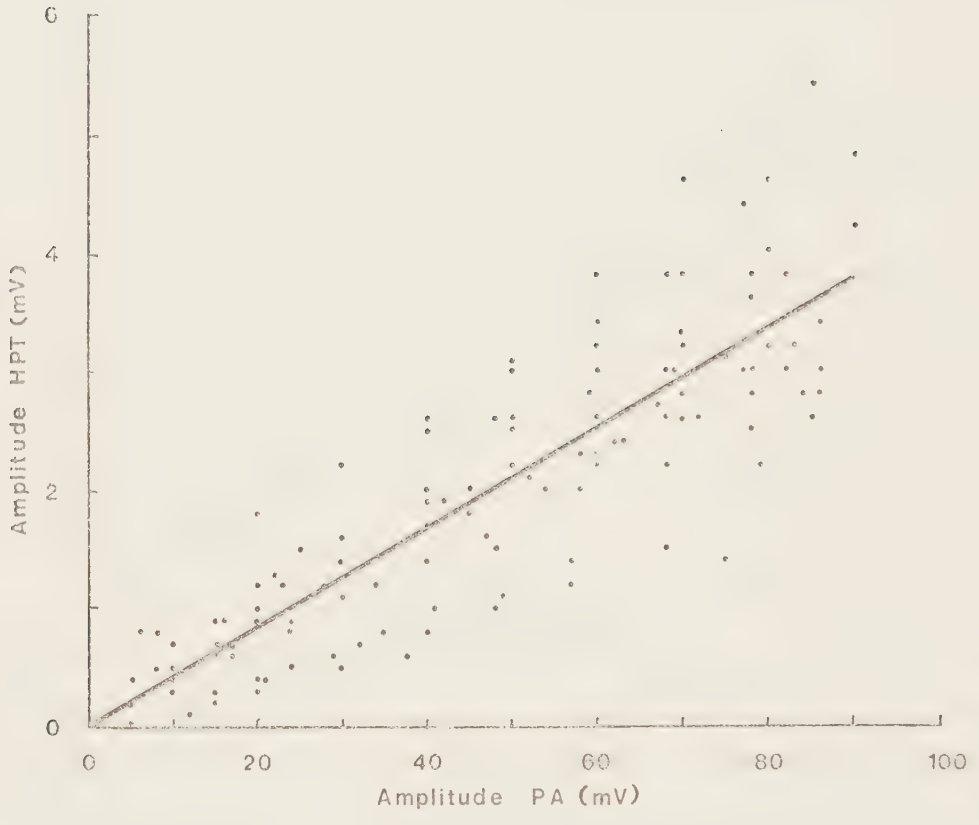
Pour chaque préparation, l'expérience consistait à imposer successivement plusieurs tétanos qui différaient les uns des autres par l'intensité des courants stimulants. Celle-ci, était ajustée, pour le premier tétanos, à une valeur juste supra-liminaire; puis elle était augmentée progressivement jusqu'à atteindre, au dernier tétanos de la série, une valeur telle que l'amplitude du potentiel d'action global soit maximale.

L'HPT correspondant à chacun de ces tétanos était enregistrée sur le scripteur à plume et les potentiels d'action évoqués par des chocs de même intensité que ceux des salves tétaniques correspondantes étaient photographiés sur l'oscilloscope.

On disposait ainsi, pour chaque préparation, d'une série de tétanos auxquels correspondaient des potentiels d'action et des HPT d'amplitudes différentes.

Résultats.

La figure 15 représente la variation d'amplitude de l'HPT en fonction de la variation d'amplitude du potentiel d'action pour une seule préparation. On voit que les points expérimentaux se répartissent le long d'une droite qui semble passer par l'origine, ce qui indiquerait une proportionnalité entre l'amplitude du potentiel d'action et celle de l'HPT. Afin de pouvoir l'affirmer, la totalité des données expérimentales correspondant à 14 préparations différentes ont été portées sur un



- Figure 16 -

Regression de l'amplitude de l'HPT par rapport à l'amplitude du PA.
Données correspondant à 14 expériences.
Comme dans la figure précédente la droite passe par l'origine des coordonnées.

graphique (figure 16) et la droite de régression a été calculée et tracée par une calculatrice électronique (Hewlett Packard 981.0). On voit ici que le nuage de points se ditribue selon une régression linéaire passant exactement par l'origine des axes de coordonnées.

Nous pouvons donc affirmer que l'amplitude de l'HPT est exactement proportionnelle à celle du potentiel d'action composé du nerf sciatique. Comme celui-ci représente en très grande partie, sinon exclusivement, l'activité des fibres myélinisées, on peut au moins conclure de cette expérience que l'amplitude de l'HPT est proportionnelle au nombre de fibres myélinisées excitées pendant le stimulus.

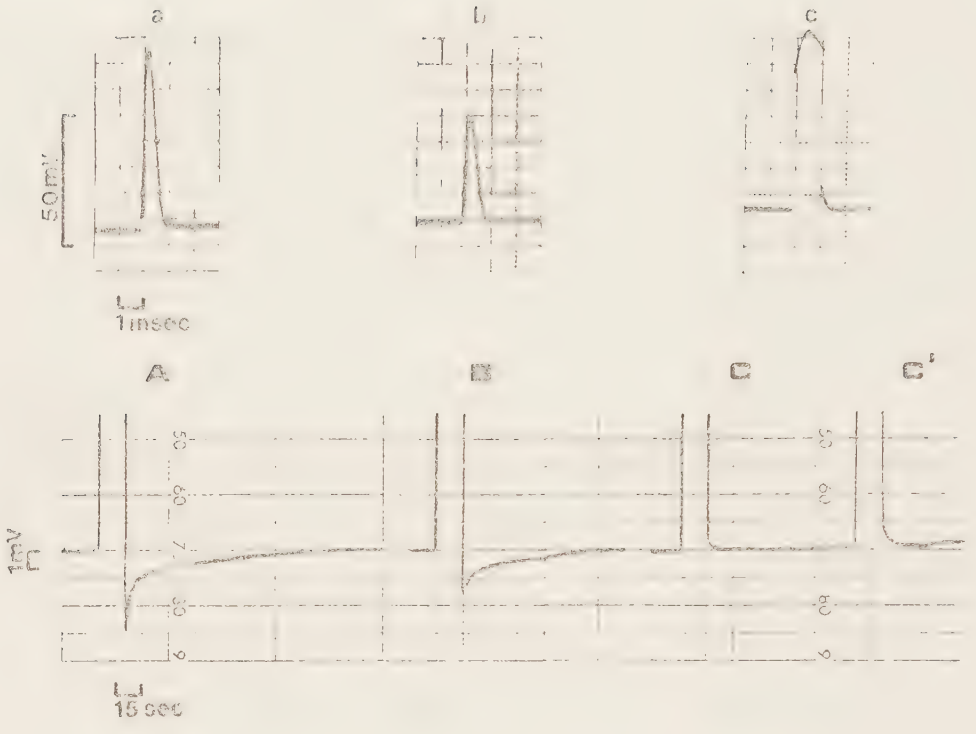
On notera que la pente de la droite de régression, dans ces conditions expérimentales, est de 4,2% ce qui représente l'amplitude relative moyenne de l'HPT par rapport au potentiel d'action. Celle-ci peut varier d'une préparation à une autre, les extrêmes rencontrés étant de 2,9 à 10,2%.

II.2 - Tetrodotoxine et amplitude de l'HPT.

La tetrodotoxine (TTX) est un inhibiteur spécifique de la perméabilité au sodium de la plupart des membranes électriquement excitables et des axones myélinisés en particulier (HILLE, 1968).

On a de bonnes raisons de penser actuellement que ce poison agit en bloquant, par inhibition non-compétitive, les canaux sodium de la membrane axonale sans affecter le mécanisme d'ouverture et de fermeture des ces pores en dépendance du potentiel de membrane. La TTX n'a aucun effet sur la perméabilité au potassium de ces membranes (NAKAHASHI, MOORE et SCOTT, 1964; HILLE, 1968). Elle n'a enfin aucune action sur les efflux actifs de sodium (BAKER, BLAUSTEIN, KEYNES, MANIL et STEINHARDT, 1969) des axones géants de Calmar.

Nous avons utilisé cet inhibiteur afin de savoir si l'HPT était liée à la dépolarisation (potentiel d'action) des



- Figure 17 -

a : PA enregistré dans le Ringer normal
A : HPT enregistrée, dans le même milieu, à la suite d'un tétanos de 15 sec à 150 Hz.
b : PA enregistré sur la même préparation après 2 minutes de lavage par une solution de Ringer contenant de la TTX à 1.10^{-6} g/ml.
B : HPT enregistrée immédiatement après le PA (b), dans le même milieu, en réponse à une salve de potentiels d'action, de 15 sec à 150 Hz.
On observe une diminution corrélative de l'amplitude du PA et de celle de l'HPT.
En c : impulsion de courant dépolarisant appliquée à la même préparation après une dizaine de minutes de lavage par la solution de TTX (à un moment où l'inhibition par la TTX est complète). Cette impulsion produit une dépolarisation de durée et amplitude approximativement égale à celles du PA initial.
C: une salve de ces impulsions (c) dépolarisantes est appliquée à la fréquence de 150 Hz pendant 15 sec à la préparation. On observe, dans ces conditions l'abolition de l'HPT.
C': au bout de 15 min de lavage avec la solution de TTX, la même salve conditionnante qu'en C donne naissance ici à une post-dépolarisation. Expériences du 6.8.72b.

fibres myélinisées pendant le tétanos ou comme nous le supposions, à l'entrée et l'accumulation de sodium dans le compartiment intra-cellulaire de ces axones.

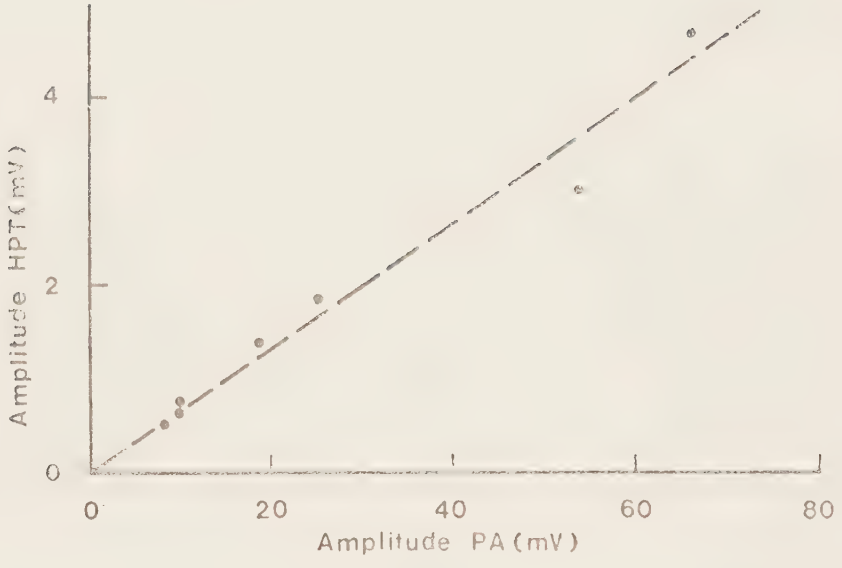
Après inhibition totale par la TTX, les axones ont été dépolarisés par des salves d'impulsions brèves simulant les potentiel
tion et produisant, en principe, les mêmes effets (sortie de potassium et accumulation dans l'espace extra-cellulaire notamment) sauf l'accumulation intra-cellulaire de sodium.

Protocole expérimental.

Les expériences ont été faites dans des conditions expérimentales dèjà décrites (stimulation juste maximale, tétanos de 15 secondes à 150 Hz). La solution de Ringer ordinaire était brusquement remplacée par une solution identique contenant la TTX à la concentration de 1.10^{-6} g/ml. Cette solution diffusait dans le nerf et atteignait progressivement un nombre de plus en plus grand d'axones de sorte que l'amplitude du potentiel d'action diminuait, bien que l'intensité de stimulation reste constante.

Ces potentiels d'action étaient photographiés à différents instants au cours de la diffusion de la solution et un tétanos était imposé immédiatement après de façon à enregistrer l'HPT correspondante (fig. 17). On a pu confirmer ainsi, par une méthode très différente, les résultats acquis dans la série d'expériences précédente. On notera cependant, que ces expériences étaient moins aisées à réaliser car la vitesse de diffusion de la TTX s'est avérée au moins aussi rapide que celle du KCl. Il s'en est suivi que sur certaines préparation il n'était pas possible d'imposer plus de trois tétanos de 15 secondes (on attendait après chacun d'eux le retour à la polarisation de repos).entre le moment où la solution était appliquée au nerf et le moment où celui-ci devenait totalement inexcitable.

Lorsque l'inhibition produite par la TTX était totale, les impulsions de stimulation étaient remplacées par des



- Figure 18 -

Variation d'amplitude de l'HPT en fonction de l'amplitude du potentiel d'action (pendant l'application d'une solution de Ringer additionnée de TTX à 1.10^{-6} g/ml).
Les points expérimentaux bien que peu nombreux, se répartissent le long d'une droite. Expérience du 4. 7.72.

impulsions de courant dépolarisant d'une durée de 1 msec (approximativement celle d'un potentiel d'action) et d'une intensité telle que la membrane soit dépolarisée de 70 à 80 mV. Une salve de ces impulsions à une fréquence de 150 Hz était appliquée à la préparation pendant 15 secondes.

Résultats.

La figure 18 montre la variation d'amplitude de l'HPT en fonction de l'amplitude du potentiel d'action global pendant l'application de la TTX.

Ici encore, on peut voir que l'amplitude de l'HPT est proportionnelle à celle du potentiel d'action.

Plus intéressantes sont sans doute les expériences d'excitation itérative lorsque la perméabilité au sodium a été totalement abolie par la TTX. On peut voir en effet dans la figure 17 (tracés c, C et C') qu'une salve d'impulsions simulant des potentiels d'action n'est plus capable d'engendrer une hyperpolarisation mais, au contraire, une légère post-dépolarisation.

Cette dépolarisation ne peut être interprétée autrement que par une accumulation de potassium dans l'espace extracellulaire puisque P_{Na} est bloquée.

On peut doncdéduire de ce résultat important que l'entrée de sodium dans les axones myélinisés est le facteur primaire de la génèse de l'HPT du nerf sciatique dans les conditions normales. Il apparaît en outre que l'augmentation de concentration en potassium dans l'espace extra-cellulaire n'est pas un signal activateur de l'hyperpolarisation post-tétanique, du moins, lorsque la perméabilité au sodium est bloquée.

On retiendra enfin, comme nous l'avions d'ailleurs soupçonné, qu'un accroissement de perméabilité au potassium, même s'il existe, ne peut par lui-même, être la cause de l'HPT.

II.3 - Variation d'amplitude de l'HPT avec la concentration en sodium dans le milieu extra-cellulaire.

Ces expériences ont été faites en supposant qu'un accroissement ou une réduction de la concentration extra-cellulaire en sodium auraient pour effet, lors de l'excitation, d'augmenter ou diminuer la quantité de sodium pénétrant dans l'axone pendant chaque potentiel d'action.

Si les interprétations proposées précédemment sont correctes, on doit s'attendre à voir croître ou décroître l'HPT dans des milieux enrichis ou appauvris en sodium.

Protocole [illegible].

Les nerfs étaient soumis à des tétanos d'une durée de 15 secondes à une fréquence de 150 Hz dans trois milieux contenant 56, 112 (Ringer) et 168 mM de NaCl soit, 50, 100 et 150% de la concentration normale.

Dans une série d'expériences, la pression osmotique est restée constante dans les trois solutions et égale à 150% de sa valeur normale dans le Ringer (le complément était réalisé par addition de saccharose). Dans d'autres cas, seules les deux premières solutions avaient une pression osmotique normale, l'hypertonie de la solution "150% Na" n'étant pas compensée. En fait, nous n'avons pas retrouvé de différence entre les résultats obtenus avec les deux séries de solutions.

Dans la solution contenant 56 mM de NaCl, le saccharose a été utilisé comme substitut du NaCl. Le sucre en effet, a été préféré au chlorure de choline, au chlorure de tétraméthyl ammonium ou de CsCl utilisés comme substituts du NaCl par de nombreux auteurs, car nous cherchions à éviter de compliquer l'interprétation de nos résultats par les variations de la perméabilité au potassium inévitablement provoquée par tous ces sels. L'inconvénient du saccharose est que la concentration

en chlorure et la force ionique des solutions ne sont pas restées constantes dans ces expériences.

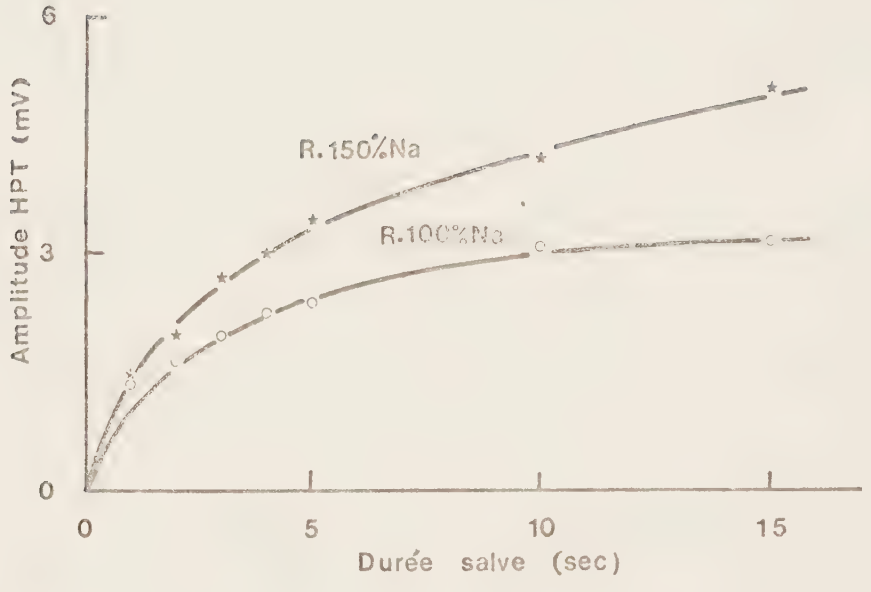
Nous ne pensons cependant pas (voir BEAUGE et ORTIZ, 1970) que les résultats que nous avons obtenus puissent être remis en cause en raison de ces faiblesses expérimentales.

Résultats.

La moyenne des résultats correspondant à des expériences faites sur 11 préparations différentes montre que l'amplitude de l'hyperpolarisation post-tétanique suit les variations de la concentration extra-cellulaire en sodium comme on peut le voir dans le tableau ci-dessous.

Concentration en NaCl par rapport au Ringer	50%	Ringer 100%	150%
Amplitude moyenne HPT	2,6 mV	3,5 mV	4,7 mV
Amplitude relative HPT par rapport au Ringer	76%	100%	134%
Variation % par rapport au Ringer	- 24%		+ 34%

Pour quatre préparations, nous avons analysé la variation d'amplitude de l'HPT en fonction de la durée des tétanos à fréquence constante (150 Hz) dans le Ringer normal, et dans le Ringer enrichi en sodium (la pression osmotique était constante et égale à 150% de sa valeur normale).



- Figure 19 -

Représentation graphique de l'amplitude de l'HPT en fonction de la durée de la salve (à une fréquence constante de 150 Hz) dans 2 milieux contenant du sodium à deux concentrations différentes 114 mM (Ringer 100% Na) et 171 mM (150% Na).
Ces courbes correspondent à la moyenne de 4 expériences. On peut observer que les 2 courbes ne tendent pas vers le même niveau maximum et que l'HPT est toujours plus grande dans le milieu enrichi en sodium que dans le Ringer ordinaire.
(Pression osmotique constante et égale à 150% de la normale).

La figure 19 montre, en représentation graphique, les résultats obtenus (moyennes pour les 4 préparations).

Il apparaît, à même durée et même fréquence de stimulation, que l'amplitude de l'HPT est toujours plus grande dans le milieu riche en sodium que dans le Ringer ordinaire.

Ce résultat, il convient de le noter, n'est pas exactement celui que nous attendions. En effet, si le sodium s'accumule dans un espace saturable comme nous l'avons supposé jusqu'ici, les deux courbes devraient tendre vers un niveau maximum et suivre un profil analogue à celui de courbes qui ont été présentées dans la figure 14.

Il semble donc qu'un facteur supplémentaire à l'entrée d'ions Na^+ complique l'interprétation des résultats. Il nous paraît peu probable que la différence entre les concentrations en ions Cl^- ou la force ionique des deux solutions soient en cause. Par contre une explication qui peut être facilement avancée est que la perméabilité au potassium n'est pas la même, à la fin d'un tétanos, dans les deux solutions. Les raisons seraient les suivantes:

- dans un milieu enrichi en sodium jusqu'à 168 mM, l'amplitude des potentiels d'action unitaires est augmentée d'une douzaine de mV (voir HUXLEY et STAMPFLI, 1951; FLICK, 1965) par rapport au Ringer ordinaire. Il s'en suit que la perméabilité au potassium (qui augmente avec la dépolarisation) pourrait être nettement plus élevée à la fin d'un tétanos dans un milieu riche en sodium que dans le milieu normal. On peut évidemment en inférer qu'elle doit être plus faible dans une solution appauvrie en sodium.

Il peut sembler paradoxal de faire appel à un changement de P_K pour expliquer ce résultat alors même que nous avons conclu que l'HPT ne résulte pas d'un accroissement de perméabilité au potassium mais de l'augmentation de la concentration en sodium intra-cellulaire. Nous ferons observer que ces conclusions n'excluent pas que l'amplitude de l'HPT puisse

dépendre de la perméabilité au potassium, bien au contraire.

En effet, si l'HPT résulte de l'augmentation du potentiel d'équilibre des ions potassium (RITCHIE et STRAUB, 1957) engendrée par l'activation d'une pompe appauvrissant l'espace extra-cellulaire en potassium, on peut prévoir que son apparition et son amplitude dépendront de $[Na]_i$; mais on doit prévoir aussi que l amplitude de l'hyperpolarisation post-tétanique dépende étroitement de P_K.

Interprétation des résultats et premières conclusions.

Au terme de cette série d'expériences, il semble que les présomptions soient très fortes pour que l'hyperpolarisation post-tétanique du nerf sciatique de Grenouille :

a/ - dépende de l'excitation des fibres myélinisées et soit proportionnelle au nombre de ces fibres activées.

b/ - soit initialement causée par une entrée d'ions sodium dans l'axoplasme des fibres myélinisées au cours de l'excitation (potentiel d'action).

c/ - ne soit pas causée par un accroissement de perméabilité au potassium .

d/ - ne soit pas causée par un accroissement de concentration en ions potassium dans l'espace extra-cellulaire et ne résulte donc pas de l'activation d'une pompe Na-K des fibres amyéliniques.

On est donc très fortement tenté de conclure que l'HPT résulte de l'activation de la pompe au sodium et au potassium des fibres myélinisées.

La série d'expériences suivante va tenter d'en apporter la preuve.

III - L'HPT EST ABOLIE PAR LES INHIBITEURS DU TRANSPORT ACTIF DE SODIUM ET POTASSIUM.

Les expériences qui vont être décrites ci-après ont eu pour but de savoir si les inhibiteurs classiques des transports actifs de sodium et potassium sont susceptibles d'abolir l'hyperpolarisation post-tétanique.

Nous rappellerons que CONNELLY avait pu montrer que le remplacement du NaCl du Ringer par du LiCl supprimait l'HPT. On peut voir dans ce résultat une forte présomption pour que l'HPT résulte de l'activation d'une pompe Na-K mais on notera qu'il ne peut avoir à lui seul valeur de démonstration comme en inférait CONNELLY.

Nous avons donc essayé d'obtenir une confirmation de cette interprétation en analysant de façon plus poussée l'action du lithium et en la complétant par une étude des effets de différents agents tels que l'ouabaïne, le 2-4 dinitrophénol, le refroidissement de la préparation et la suppression du potassium du milieu de survie. Dans ce dernier cas, nous n'avons pu obtenir des résultats concluants, nous décrirons donc rapidement ces expériences et tenterons d'expliquer la cause de notre échec.

III.1 - La suppression des ions K^+ du Ringer n'a aucun effet sur l'HPT.

Depuis les expériences de STEINBACH (1940), il est connu que, sur de très nombreux tissus, l'absence de potassium dans le milieu extra-cellulaire inhibe le transport actif de sodium (HARRIS et MAIZELS, 1951; KEYNES, 1954; HODGKIN et KEYNES, 1955; NAKAJIMA et TAKAHASHI, 1966; RANG et RITCHIE, 1968; THOMAS, 1969). Il était donc important de savoir si la réduction de $[K]_e$ pouvait inhiber la HPT .

Les expériences ont consisté à imposer à la préparation des tétanos de 15 secondes à une fréquence de 150 Hz.

a/ - dans le Ringer ordinaire contenant 2,5 mM de KCl.

b/ - dans un Ringer dont la totalité du potassium a été supprimée.

Lors du passage d'une solution à l'autre, le potentiel de repos de la préparation augmente légèrement (1 à 2 mV) mais la post-hyperpolarisation reste inchangée par rapport à ce qu'elle est dans le Ringer ordinaire, même après un séjour de plus d'une heure dans la solution sans K^+.

Ce résultat n'est pas plus satisfaisant si l'on suppose que l'HPT résulte de l'activation d'une pompe que si ce phénomène procède d'un accroissement de P_K. Il ne peut être expliqué que si l'on admet qu'après un tétanos, l'espace extra-cellulaire est ré-approvisionné en ions K^+ sortis des axones pendant l'excitation; même si le milieu de survie est totalement dépourvu de potassium.

Cette supposition est très fortement soutenue par l'interprétation que l'on peut donner des tracés présentés dans les figure 17 (C') et 22 où l'on voit, dans deux cas où l'HPT est abolie, qu'une post-dépolarisation s'installe à la suite d'une excitation itérative. Cette dépolarisation ne peut être interprétée que par une accumulation de potassium dans l'espace extra-cellulaire.

Nous pensons donc que ces résultats négatifs ne mettent pas en cause, dans le cas d'une préparation massive comme le nerf sciatique, l'interprétation que nous avons donnée jusqu'à présent de l'HPT.

III.2 - L'amplitude de l'HPT décroît avec le refroidissement de la préparation.

Il est connu que l'incubation à basse température de tissus vivants se solde, à long terme, par l'égalisation des con-

centrations ioniques des compartiments intra et extra-cellulaire (POST et JOLLY, 1957). La raison est que les transports actifs, comme beaucoup de réactions chimiques, sont inhibés par l'abaissement de la température.

En ce qui concerne le transport couplé de sodium et potassium, il a été montré (KINSOLVING, POST et BEAVER, 1963; AHMED et JUDAH, 1965) que l'hydrolyse exergonique de l'ATP est fortement réduite par l'abaissement de température et bloquée, sur le tissu rénal de Mammifères, à partir de 14°C (CHARNOCK, 1971).

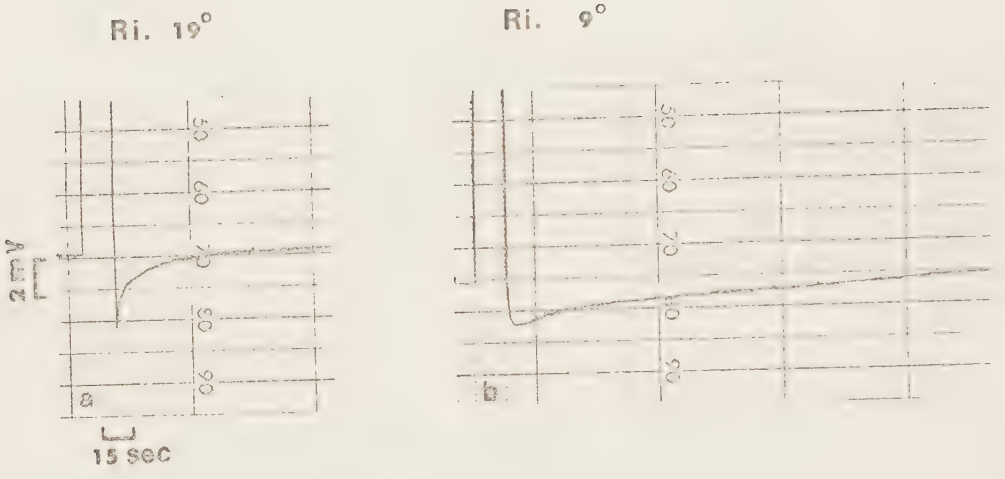
Indirectement, le potentiel de membrane décroît, en particulier si la pompe Na-K est électrogène (CARPENTER,1970). L'hyperpolarisation post-tétanique des nerfs de Mammifères est réduite par l'abaissement de température en dessous de 35°C (RITCHIE et STRAUB, 1957); le Q_{10} de cette HPT est de 2,6 (DEN HERTOG et RITCHIE, 1969).

Nous avons donc imposé au nerf sciatique de Grenouille, dans le Ringer ordinaire à 20°C, des tétanos de 15 secondes à une fréquence de 150 Hz. Cette solution était brusquement remplacée par un Ringer identique dont la température était abaissée à 9°C.

Dès l'application de la solution froide, le potentiel d'action s'allonge et le pic initial de l'hyperpolarisation post-tétanique diminue (fig. 20). Si l'on prolonge la durée du lavage pendant une vingtaine de minutes, on constate que l'amplitude de l'HPT décroît progressivement. L'HPT a été totalement abolie pour une seule préparation parmi les neuf que nous avons soumises à ce traitement.

Si l'on rétablit brusquement la température normale, le potentiel d'action retrouve immédiatement son décours d'origine et le pic initial de l'HPT réapparaît mais la restauration complète nécessite une vingtaine de minutes.

Si ces résultats sont satisfaisants d'un point de vue purement qualitatif, et en très bon accord avec l'hypothèse



- Figure 20 -

Effet de l'abaissement de température sur l'amplitude et le décours de l'HPT obtenue après stimulation de la préparation pendant 15 sec à 150 Hz, et dans le Ringer ordinaire:
en a à 19°C
en b à 9°C.

Noter l'augmentation de la durée de l'HPT et la réduction de son amplitude dans le milieu refroidi .

selon laquelle l'HPT reflète l'activité d'une pompe Na-K, ils n'en sont pas moins difficiles à interpréter en ce qui concerne la dualité des effets du froid.

Il nous semble difficile d'imaginer que la préparation, dans la tubulure centrale de l'appareil de mesure (double pont saccharose), ne soit pas, très rapidement et totalement, mise en équilibre thermique avec la solution circulante. Nous pensons donc que les faits observés ne relèvent en aucune façon de contingences ou d'artefacts expérimentaux.

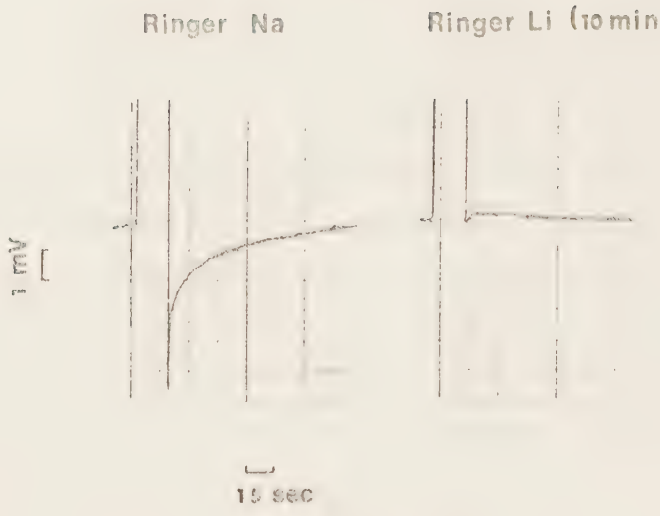
Tout se passe comme si le froid ralentissait très brusquement la mobilité des transporteurs puis, à long terme, réduisait les sources d'énergie, faute sans doute d'une vitesse de synthèse suffisante. Cette interprétation, nous en convenons est spéculative et ne peut s'appuyer sur aucune donnée sérieuse mais on doit reconnaître que si l'HPT procédait d'un changement de perméabilité de la membrane passive, l'effet retardé de l'abaissement de température serait rigoureusement inexplicable.

Nous concluons donc que mieux qu'un Q_{10} à la valeur incertaine et dont la signification est souvent douteuse, (voir controverse KUNO, MIYAHARA et WEAKLY, 1970;et GUSTAFSSON, LINDSTROM et TAKATA, 1971) nos résultats montrent que l'HPT ne peut résulter seulement d'un changement de perméabilité membranaire et donc, traduit en grande partie au moins l'activation d'une pompe Na-K.

N.B. - On peut signaler ici que ces expériences ont été souvent perturbées par une dérive des enregistrements dûe à des condensations de vapeur d'eau sur la préparation au voisinage de la tubulure centrale froide. Pour cette raison nous hésitons à tirer des conclusions fondées sur une analyse quantitative de nos résultats (Q_{10}).

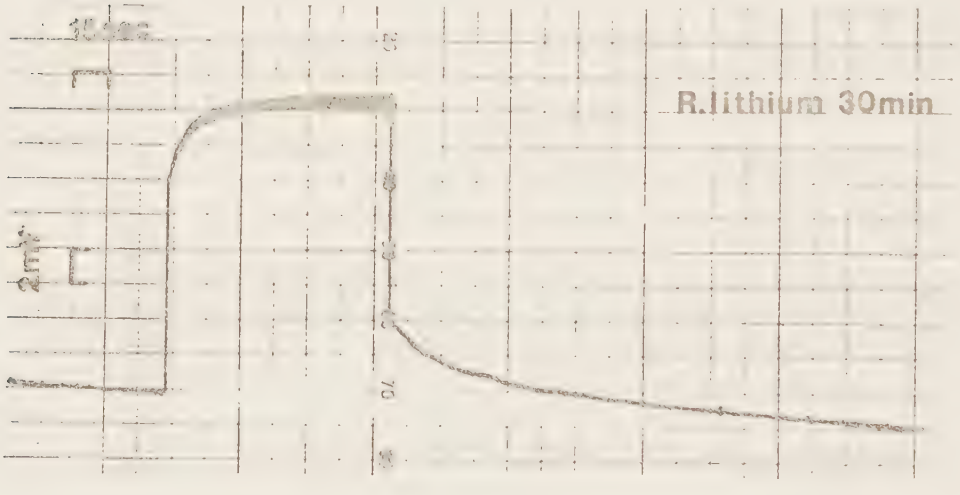
III.3 - L'HPT est abolie dans le Ringer lithium.

Les ions lithium peuvent remplacer les ions sodium dans les phénomènes d'excitation membranaire (OVERTON, 1902;



- Figure 21 -

Effet des ions Li sur l'HPT.
La fréquence de stimulation était de 150 Hz pendant 15 sec au cours du tétanos.
A gauche : en Ringer ordinaire.
A droite : dans un Ringer où le LiCl a été totalement substitué au NaCl. On constate qu'après 10 minutes de passage de cette solution , l'HPT a disparu. Expérience du 10.2.71.



- Figure 22 -

Dépolarisation post-tétanique obtenue dans le Ringer lithium (figure 21), après lavage de la préparation, pendant 30 minutes.
La fréquence de stimulation tétanique était de 150 Hz.
La dépolarisation post-tétanique est interprétée comme résultant d'un accroissement de la concentration en potassium dans l'espace extra-cellulaire lorsque la pompe Na-K est bloquée par les ions Li.

HODGKIN et KATZ, 1949; CHANDLER et MEVES, 1965, HILLE, 1971). On sait cependant que ces cations ne sont pas reconnus par le transporteur actif de sodium (HARRIS et MAIZELS, 1951; KEYNES et SWAN, 1959). Il s'en suit que l'HPT est abolie si le compartiment intra-cellulaire est chargé en lithium (KITCHIE et STRAUB 1957; CONNELLY, 1959, WEOPI, 1969; THOMAS, 1969).

Nous avons donc soumis nos préparations à un Ringer contenant 112 mM de LiCl en remplacement du sodium. Les tétanos imposés étaient toujours les mêmes (15 sec, 150 Hz).

Résultats.

Les effets du lithium sur l'HPT sont en général assez rapides . L'abolition complète du phénomène était habituellement obtenue après une dizaine de minutes (fig. 21). Le potentiel de repos subissait une légère dépolarisation de l'ordre de 1 à 2 mV. Ces résultats confirment ceux de CONNELLY obtenus sur la même préparation et expliquent des expériences de CERF (1955) desquelles il ressortait qu'à long terme le lithium était un poison des fibres nerveuses myélinisées.

Après une demi-heure d'exposition au Ringer lithium l'amplitude des potentiels d'action commence à décroître sensiblement et un tétanos de longue durée (fig. 22) conduit à l'apparition d'une post-dépolarisation marquée que nous interprétons comme le résultat d'une accumulation de potassium dans le milieu extra-cellulaire.

La figure 23 montre que la résistance de membrane, mesurée par la méthode des "square pulses" (application d'impulsions de courant constant) n'est pas changée par le lithium pour les valeurs de potentiel correspondant à des dépolarisations. On serait donc tenté de conclure que la conductance potassium des axones myélinisés n'est pas modifiée par le lithium et donc, que l'on ne peut interpréter l'abolition del'HPT par une diminution de P_K.

On notera néanmoins, sur la figure 23, que la résis-

- Figure 23 -

tance de membrane augmente pour les valeurs de potentiel correspondant à des hyperpolarisations. Il n'est pas possible, sur la seule base de ces expériences, d'expliquer la cause de ce changement de résistance. Il pourrait cependant rendre compte d'une réduction d'amplitude de l'HPT si celle-ci dépend des perméabilités passives de la membrane.

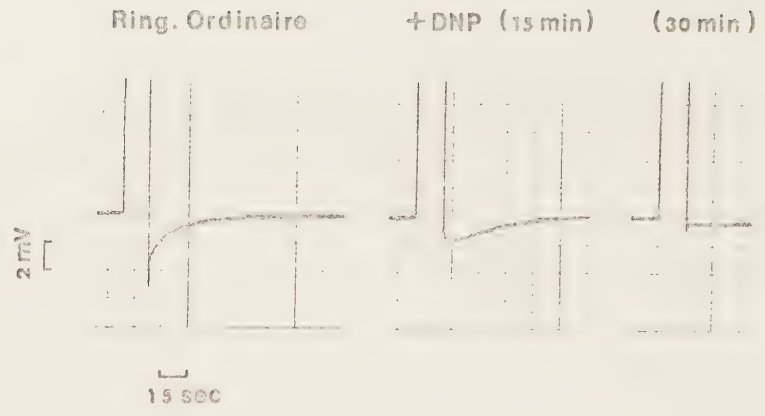
Cette variation de résistance ne peut toutefois, à elle seule, expliquer la suppression totale de l'HPT. Nous considérons donc qu'il s'agit d'un phénomène secondaire qui vient se superposer à l'action inhibitrice des ions Li sur le transport actif.

Quelques expériences complémentaires ont été réalisées afin de savoir si l'HPT ne pourrait pas être abolie par une diminution du potentiel d'équilibre du potassium, elle-même causée par un arrêt des transports actifs (voir KEHOE et ASCHER, 1970). Si tel était le cas, l'HPT procèderait d'un accroissement de P_K et une dépolarisation continue de la membrane à un niveau de potentiel plus positif que le nouvel E_K, devrait rétablir une post-hyperpolarisation. Inversement, une hyperpolarisation constante à un niveau plus négatif devrait aboutir à une post-dépolarisation tétanique.

Ces variations de polarisation ont été obtenues en appliquant des courants constants dépolarisants ou hyperpolarisants juste à la fin du tétanos. Nous n'avons jamais pu rétablir d'hyperpolarisation post-tétanique dans ce cas. Cependant, pour deux préparations, une très brève pointe de faible amplitude a pu être obtenue juste à la fin du tétanos, ce qui tendrait à indiquer que l'HPT peut, dans sa phase initiale, dépendre d'une variation de perméabilité au potassium.

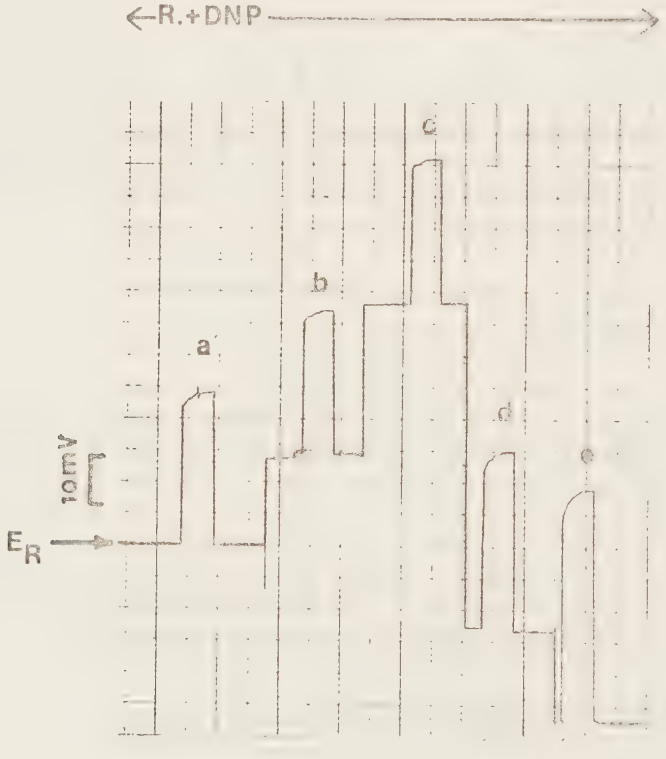
Nous reviendrons sur ce point ultérieurement à l'occasion d'une analyse plus démonstrative, et nous retiendrons en définitive que l'abolition totale de l'HPT par le lithium ne peut-être expliquée par les variations secondaires de perméabilité ou de E_K que ce cation produit.

Nos expériences tendent donc à montrer que l'HPT



- Figure 24 -

Effet du 2-4-dinitrophénol sur l'hyperpolarisation post-tétanique. 0,5 mM de 2-4-DNP ont été ajoutés au liquide physiologique. L'HPT est très diminuée après 15 minutes de lavage par la solution. Elle est abolie, dans cette expérience en une trentaine de minutes. Expérience du 28.5.71.



- Figure 25 -

Afin de savoir si l'abolition de l'HPT, en 2-4-DNP, ne résulte pas d'un déplacement de E_R, la préparation est polarisée à différents niveaux après un temps de passage de l'inhibiteur suffisamment long pour que l'HPT ait été abolie. On voit nettement qu'au potentiel de repos normal (a), la dépolarisation tétanique n'est pas suivie d'une HPT. L'HPT n'est pas restaurée aux niveaux dépolarisants (b et c), elle ne l'est pas non plus si on hyperpolarise la préparation (d et e).

résulte avant tout de l'activation d'une pompe Na-K inhibée par le lithium.

Les deux expériences suivantes vont très sérieusement renforcer cette présomption.

III.4 - Le 2-4 dinitrophénol abolit l'HPT du nerf sciatique.

Le 2-4 dinitrophénol (DNP) est un agent découplant les oxydations des phosphorylations. Ce poison agit donc en privant le système transporteur actif de sa principale source d'énergie, l'ATP.

Dans nos expériences, le DNP a été ajouté au Ringer ordinaire à raison de 0,5 mM par litre.

Le lavage continu de la préparation par cette solution conduit à la diminution progressive de l'HPT et finalement, à son abolition totale en une trentaine de minutes (fig. 24).

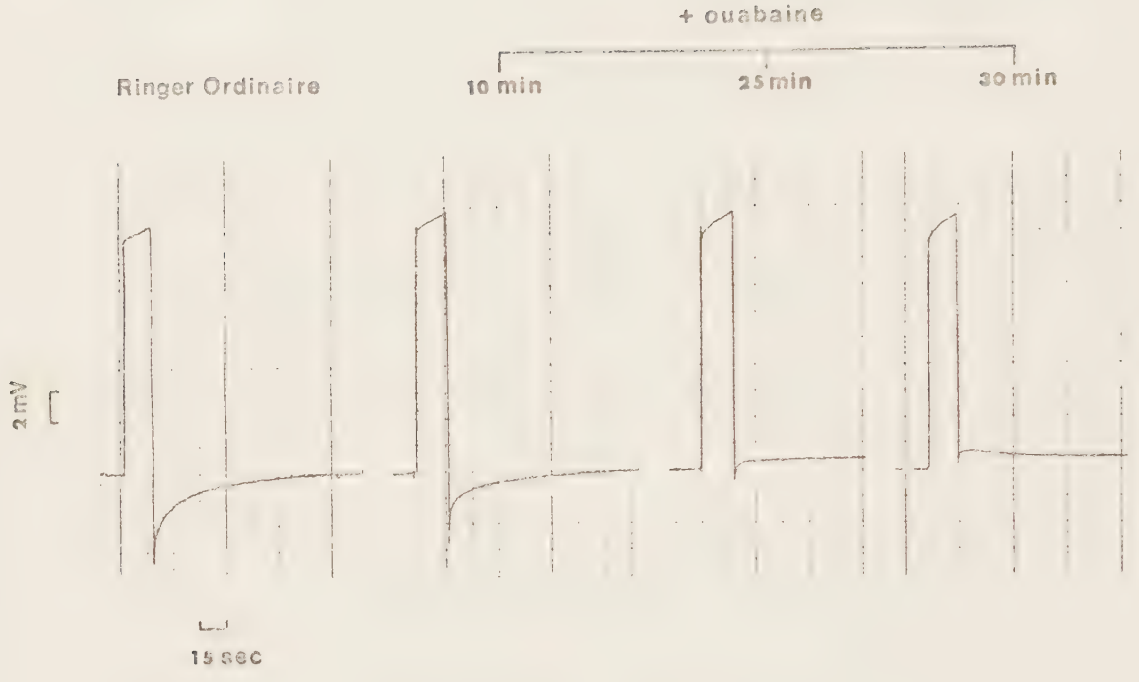
Ce résultat est donc conforme à celui que l'on devait attendre si l'HPT résulte de l'activation d'un transport actif de sodium et potassium.

Comme pour le lithium, nous avons cherché à savoir si cette disparition ne pouvait relever d'un déplacement de E_K. Nous avons donc polarisé la préparation à différents niveaux du potentiel de membrane afin de savoir si l'hyperpolarisation pouvait être restaurée. La figure 25 montre qu'il n'est pas possible de faire réapparaître l'HPT par des variations de la polarisation membranaire.

Ces résultats sont donc en bon accord avec nos conclusions précédentes.

III.5 - L'HPT est abolie par l'ouabaïne.

L'ouabaïne (ou strophantine G) est l'inhibiteur spécifique du transport actif de Na^+ et K^+ (SCHATZMANN, 1953). Ce



- Figure 26 -

Effet de l'ouabaïne sur l'hyperpolarisation post-tétanique.
1 mM d'ouabaïne ajoutée au Ringer ordinaire réduit (en 10 minutes) puis abolit (en 25 minutes) l'HPT. Celle-ci est remplacée, après 30 minutes de lavage, par une post-dépolarisation que l'on peut attribuer à une accumulation d'ions K^+ dans l'espace extra-cellulaire.

poison agirait (voir schéma chapitre 1) en partie au moins par inhibition compétitive de la prise en charge du potassium par le transporteur phosphorylé sur la face externe de la membrane (GLYNN, 1957; HOFFMAN, 1964; BAKER, 1970) il pourrait agir aussi en inhibant la déphosphorylation du transporteur lors de sa translocation (POST, SEN et ROSENTHAL, 1965).

Nous avons donc soumis nos préparations à une solution de Ringer contenant l'ouabaïne à la concentration de 1 mM par litre. La figure 26 montre l'évolution typique de l'hyperpolarisation post-tétanique pendant l'application du poison. On voit que l'amplitude décroît et cède la place à une post-dépolarisation.

L'ouabaïne, en général, agit plus lentement que le lithium comme on peut le voir dans la figure 26, où, 30 minutes après application de la solution, une brève pointe subsiste encore à la fin du tétanos; elle disparaît totalement en une quarantaine de minutes.

Ce temps d'action nous a paru étonnamment long pour une substance supposée agir sur la face externe des membranes axonales. Il semble en fait que ce soit sa vitesse de diffusion dans le tronc nerveux qui soit le facteur limitant de sa vitesse d'action car, sur des préparations dilacérées, nous avons pu obtenir des abolitions complètes de l'HPT en une quinzaine de minutes.

Nous pensons donc pouvoir conclure, ici encore, que nos résultats, d'un point de vue qualitatif, sont en excellent accord avec l'hypothèse selon laquelle l'HPT reflète l'activation d'une pompe au sodium stimulée par l'augmentation de la concentration intra-cellulaire en ions Na^+.

A ce sujet on notera que nous avons toujours observé, après des expositions prolongées (30 à 40 minutes) aux différents inhibiteurs des transports, que l'amplitude des potentiels d'action diminuait (10 à 25% de l'amplitude maximum).

Le 2-4 dinitrophénol, de ce point de vue, nous a paru avoir une action dépressive plus rapide que l'ouabaïne contrairement à ce que nous attendions.

IV - ANALYSE DU DECOURS TEMPOREL DE L'HPT.

La fonction de la pompe Na-K est d'expulser le sodium entré passivement dans l'axoplasme et de réabsorber le potassium perdu. Ceci implique que son activité soit liée, d'une façon ou d'une autre, aux échanges ioniques passifs.

A ce titre, on sait (THOMAS, 1969), que l'activité de la pompe est approximativement proportionnelle à la concentration intra-cellulaire en sodium. Il s'en suit qu'après une période d'excitation prolongée, l'activité de la pompe est temporairement augmentée par rapport à son régime d'entretien (c.à d. lorsque la cellule est au repos).

On peut donc prévoir que cette extra-activité soit finalement proportionnelle à la durée d'un tétanos à fréquence constante.

Si l'HPT représente, comme nous avons de bonnes raisons de le penser, l'activité de la pompe, elle doit, d'une façon ou d'une autre (amplitude, durée ou "surface"), dépendre de la durée des tétanos conditionnants.

Il importe cependant d'observer que cette hyperpolarisation ne sera pas nécessairement proportionnelle à la durée d'un tétanos si elle exprime l'activité de la pompe indirectement. Ainsi, si l'on suppose que l'HPT représente la vitesse de pompage via la variation de concentration en potassium dans l'espace extra-cellulaire (RITCHIE et STRAUB, 1957), on peut attendre que $[K]_e$ diminue proportionnellement à l'activité de la pompe. Mais dans ces conditions, et toutes choses égales par ailleurs, on doit attendre que l'amplitude de l'HPT varie comme log de $[K]_e$ et non comme $[K]_e$ (et la vitesse de pompage). Si l'on ajoute à cela que lors de l'augmentation de potentiel créée par l'abaissement de $[K]_e$, les perméabilités passives de la membrane (et P_K en particulier) ont toutes chances de varier, il apparaît qu'il existe peu de raisons pour que l'amplitude de l'HPT traduise fidèlement la vitesse de pompage du système transporteur Na-K.

Il peut se faire toutefois, que l'amplitude de l'hyperpolarisation reflète la vitesse maximum de pompage (RANG et RITCHIE, 1968) si la pompe est électrogène et si l'hyperpolarisation est l'image du transport net de charges qui caractérise ce type de pompe.

En définitive, il est important de connaître la fonction qui peut lier un ou plusieurs paramètres caractérisant l'HPT à la durée des tétanos conditionnants.

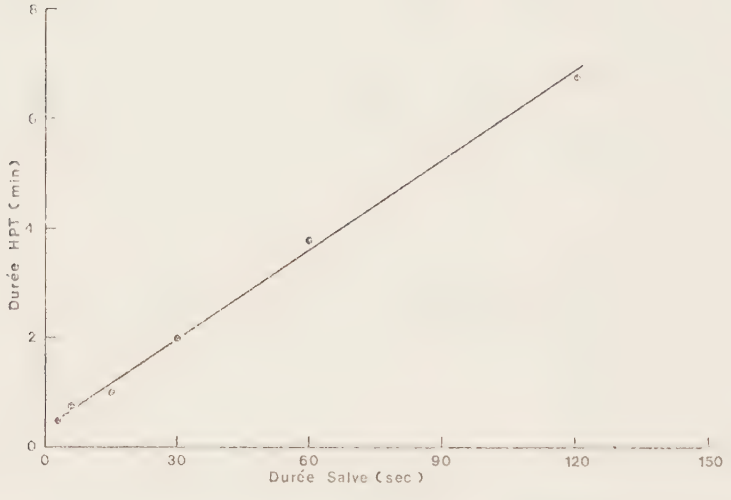
Nous avons déjà montré (I.1 et fig. 12) qu'au-delà d'une certaine durée, l'amplitude de l'HPT n'augmente plus, quelle que soit la durée du tétanos. Ceci signifie qu'à partir d'une certaine quantité de sodium entré dans le compartiment intra-cellulaire, le paramètre amplitude de l'HPT devient indépendant de de tout apport supplémentaire en Na^+. Dans ces conditions, si l'HPT reflète effectivement l'activité de la pompe, le paramètre durée doit augmenter avec la durée du tétanos. S'il n'en est pas ainsi, l'interprétation que nous donnons de l'HPT pourrait être remise sérieusement en question.

Par ailleurs, il serait important de savoir si le niveau de "saturation" apparent de l'HPT est l'expression d'une capacité de transport maximum (TM ou vitesse maximum) de la pompe Na-K. Dans ce cas, on pourrait prévoir que la durée de l'HPT soit proportionnelle à la durée du tétanos lorsque le TM est atteint. Une autre possibilité serait que l'amplitude maximum résulte d'une saturation du système par lequel s'exprime indirectement l'activité de la pompe.

Ces raisons nous ont donc incitée à entreprendre une série d'expériences afin d'analyser le décours temporel de l'HPT.

IV.1 - La durée de l'HPT croît avec la durée du tétanos.

Dans ces expériences, la durée de l'HPT a été mesurée après un tétanos conditionnant dont la [illegible] des à 2 minutes. La fréquence de ces t[illegible] (150 Hz).



- Figure 27 -

Graphique représentant la durée de l'HPT en fonction de la durée de la salve conditionnante (fréquence 150 Hz). Moyenne de 6 expériences.
La durée de l'HPT (mesurée entre la fin de la stimulation et le moment où la polarisation de repos est retrouvée) croît linéaire ment avec la durée du tétanos.

La durée de l'HPT est le temps écoulé entre la fin du tétanos et l'instant où la polarisation normale de la membrane au repos est retrouvée (fin de l'hyperpolarisation). Ce temps est incertain dès que survient une dérive spontanée du niveau de référence (potentiel de repos apparent). Il s'en suit que nous avons dû éliminer toutes les expériences dans lesquelles le potentiel de repos n'était pas rigoureusement constant.

La figure 27 représente la loi [illegible] obtenus sur six préparations particulièrement stables.

Il apparaît clairement que la durée de l'HPT, telle que nous l'avons définie, augmente linéairement avec la durée du tétanos. Mais on doit noter que la droite ne passe pas par l'origine des axes de coordonnées.

Tout se passe comme si les tétanos de brève durée donnaient lieu à des HPT de durée relativement plus grande que les tétanos de longue durée (supérieure à 5 secondes).

Cette interprétation trouve sa confirmation dans l'analyse cinétique de l'HPT présentée ci-après. Elle fait rejeter la possibilité que l'HPT contienne dans sa durée une composante irréductible comme pourrait le laisser supposer, en première analyse, une extrapolation de la droite au temps zéro (extrapolation qui d'ailleurs n'aurait aucun sens puisque l'HPT n'existe pas sans tétanos conditionnant).

On retiendra donc de ces expériences :

a/ - la variation linéaire de la durée de l'HPT en fonction de celle du tétanos, ce qui est en excellent accord avec l'hypothèse selon laquelle l'HPT reflète l'activité d'une pompe. On ne voit pas en effet, comment cette durée pourrait augmenter indéfiniment si l'HPT procédait d'un accroissement de perméabilité au potassium.

b/ - la très grande durée de l'HPT qui peut atteindre 7 minutes dans le cas de ces expériences et certainement beaucoup plus encore si la durée des tétanos était prolongée.

- Figure 28 -

Représentation en coordonnées semi-logarithmiques de la variation du potentiel de membrane en fonction du temps pendant une hyperpolarisation post-tétanique (Ringer normal à 20°C).
On voit que l'HPT peut être facilement décomposée en 2 droites de pentes différentes. Son décours comporte donc 2 exponentielles décroissantes du temps. Les constantes de temps T_1 et T_2 correspondent respectivement à la phase initiale (HPT_1) et à la phase retardée (HPT_2). Dans cette expérience T_1 = 5 sec et T_2 = 40 sec.

IV.2 - Le décours temporel de l'HPT se décompose en deux exponentielles de constantes de temps différentes.

Nous avons déjà fait observer (fig. 10) que l'HPT semblait pouvoir être décomposée en deux phases, l'une initiale et ample à décroissance rapide, l'autre à décroissance plus lente.

Nous avons analysé le décours temporel de l'HPT obtenue sur plusieurs préparations après des tétanos de 15 secondes à 150 Hz.

La figure 28 représente, en coordonnées semi-logarithmiques, la variation typique du potentiel de membrane d'une préparation au cours du temps. Dans cette représentation, l'HPT peut être décomposée en deux droites de pentes inégales, ce qui signifie que le décours temporel de l'HPT est décomposable en deux exponentielles décroissantes et de constantes de temps très différentes.

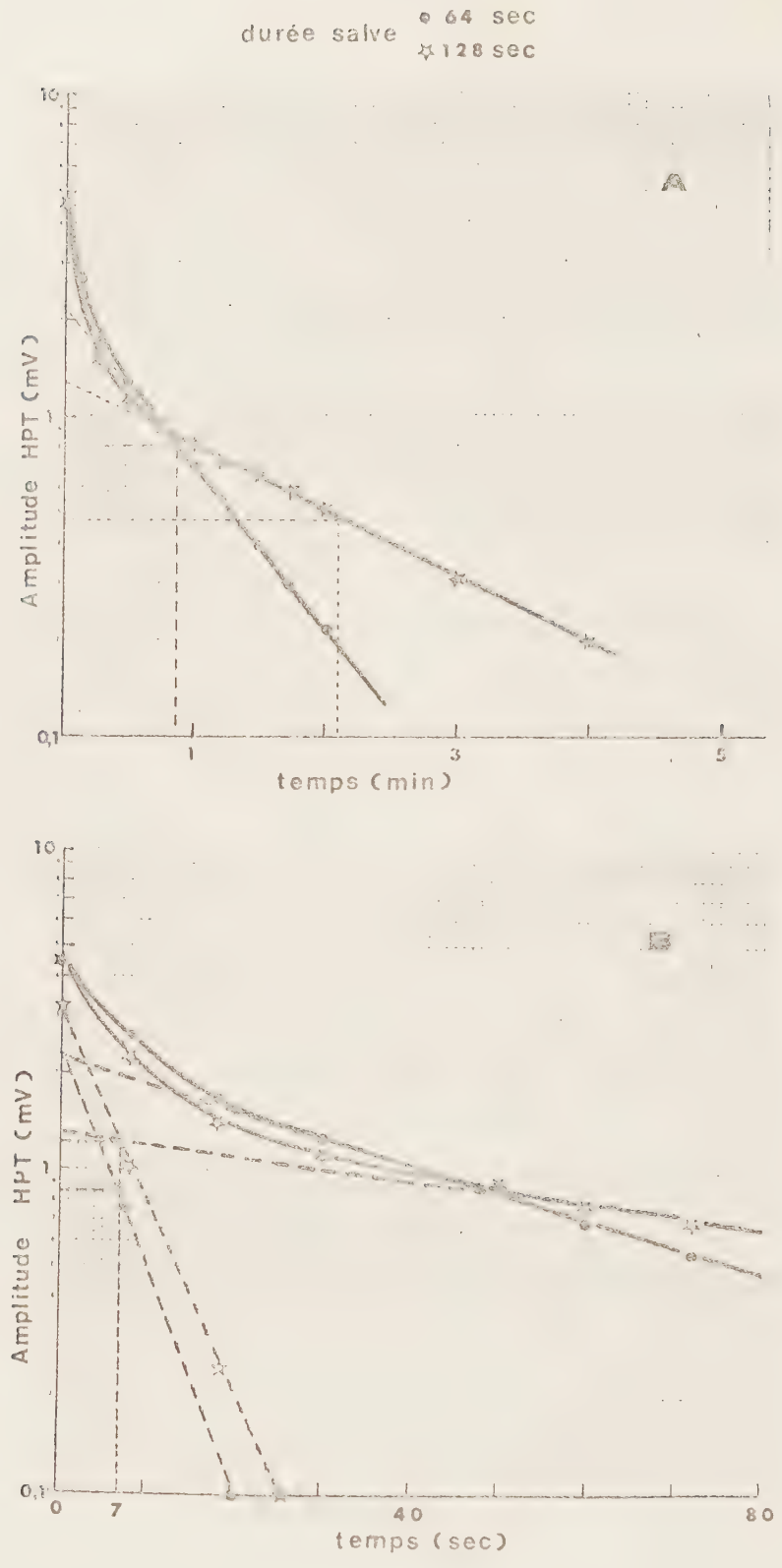
N.B. - Les constantes de temps ont été mesurées sur les graphiques de la façon suivante : - l'amplitude était obtenue par extrapolation au temps zéro; la constante de temps T est définie comme le temps au bout duquel l'amplitude de l'HPT a diminué d'un facteur égal à e depuis sa valeur maximum au temps t = 0.

Le tableau suivant donne quelques valeurs des deux constantes T_1 et T_2 établies d'après des tracés correspondant à 5 expériences faites à différentes époques et à la même température (21°C).

T_1 est la constante de temps de la phase initiale,

T_2 est celle de la phase tardive.

expérience	T_1(sec)	T_2(sec)	T_2/T_1
14-1-72	5	40	8
15-2-71	2,5	18	7,5
25-11-71	3	30	10
9-2-70	4	35	8,7
20-3-72	2,5	25	10
moyennes	3,4	29,6	8,8



- Figure 29 -

Amplitude de l'HPT en fonction du temps pour 2 durées de salve tétanique conditionnante : (64 et 128 sec) dans le Ringer ordinaire à la température de 20°C.
En A : constante de temps de la phase retardée, T_2 = 55 sec après une salve de 64 sec et 130 sec après la salve de 128 sec.
En B : constante de temps de la phase initiale de l'HPT. T_1 est de l'ordre de 7 sec pour les deux durées du tétanos conditionnant.

Ces résultats montrent qu'en moyenne, la constante de temps de la deuxième phase est approximativement 9 fois plus grande que celle de la deuxième. Mais le fait que le rapport T_2/T_1 ne soit pas constant suggère que deux phénomènes, indépendants l'un de l'autre, doivent pouvoir expliquer les deux phases de l'HPT.

Les expériences suivantes ont été mises en oeuvre afin de vérifier l'indépendance éventuelle de T_1 et T_2.

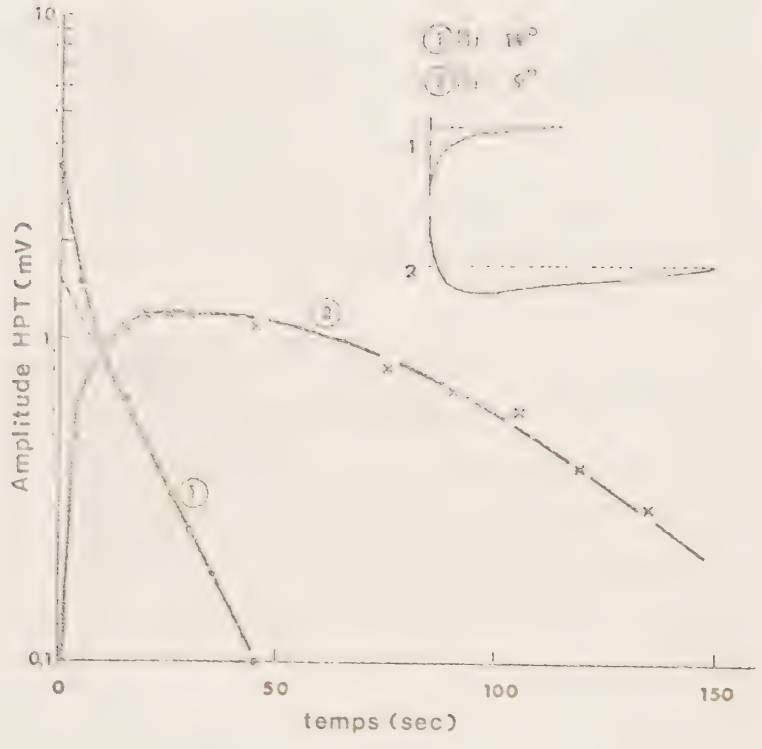
III.3 - T_1 [illegible] nos alors que T_2 augmente avec la durée de la stimulation.

Le fait que la durée de l'HPT augmente avec la durée des tétanos alors que l'amplitude maximum est constante (fig. 12) après une trentaine de secondes (pour une fréquence de 150 Hz) laisse prévoir que l'une au moins des deux constantes de temps augmente avec l'accroissement de la durée du tétanos. Nous avons voulu savoir comment variaient T_1 et T_2 en espérant, par ce moyen, confirmer l'indépendance suggérée par la variation des rapports T_2/T_1 d'une préparation à une autre.

Les mesures de T_1 et T_2 ont été effectuées sur des HPT survenant après des tétanos de 64 et 128 secondes à fréquence constante (150 Hz).

La figure 29 A et B montre, en coordonnées semi-logarithmiques, que la phase lente est très nettement augmentée la constante de temps T_2 atteint 55 et 130 secondes pour ces deux tétanos respectivement. La phase initiale par contre, est inchangée (T_1 = 7 secondes). Les rapports T_2/T_1 varient donc de 8 à 18, ce qui tend à démontrer une indépendance entre les deux phases qui, on le notera, conservent un décours exponentiel.

Cette analyse a été complétée par l'étude des variations de T_1 et T_2 en présence d'inhibiteurs du transport Na-K.



- Figure 13 -

Effets de l'abaissement de la température sur les constantes de temps de l'HPT.
Représentation en coordonnées semi-logarithmiques du décours de l'HPT en fonction du temps, dans le Ringer normal à 19° et 9°C.
Les figures A et B correspondent à deux préparations différentes.
1 - à 19°C
2 - à 9°C après 30 minutes de passage de la solution. On voit que la durée de l'HPT est augmentée.
Noter que l'on ne retrouve plus les 2 exponentielles du temps observées à 19° C.

IV.4 - Le décours temporel de l'HPT n'est plus exponentiel à b[illegible] température.

Avec pour objectif de déterminer le Q10 des deux constantes de temps T_1 et T_2 , nous avons tenté de comparer le décours temporel de l'HPT survenant après des tétanos conditionnants [illegible] 15 secondes à 150 Hz, d'une part à la température du laboratoire (20°C en moyenne) d'autre part, à basse température (9°C).

Cette étude s'est avérée délicate pour deux raisons:

a/ - à basse température, comme nous l'avons déjà dit, la phase initiale de l'HPT disparaît très rapidement, alors que la deuxième phase varie continuellement et lentement avec le temps d'exposition à une solution physiologique refroidie,

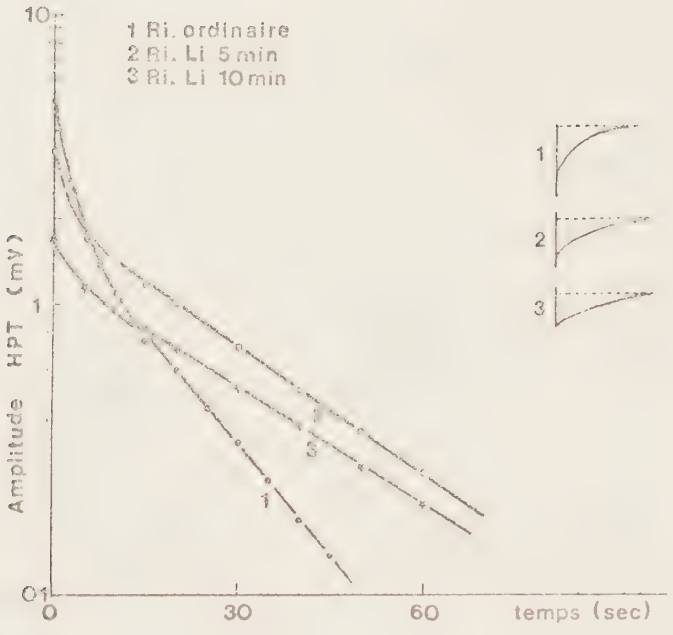
b/ - le décours temporel de la phase lente n'est plus exponentiel.

La figure 30 montre, en coordonnées semi-logarithmiques, le traitement de ces résultats expérimentaux pour une préparation lavée par une solution de Ringer à 19° et 9°C.

On voit qu'à la température habituelle du laboratoire, les deux phases correspondent parfaitement à des exponentielles décroissantes du temps alors qu'à basse température, les points expérimentaux ne se répartissent plus le long de droites; la déviation est alors d'autant plus prononcée que le temps d'exposition à la solution froide est grand.

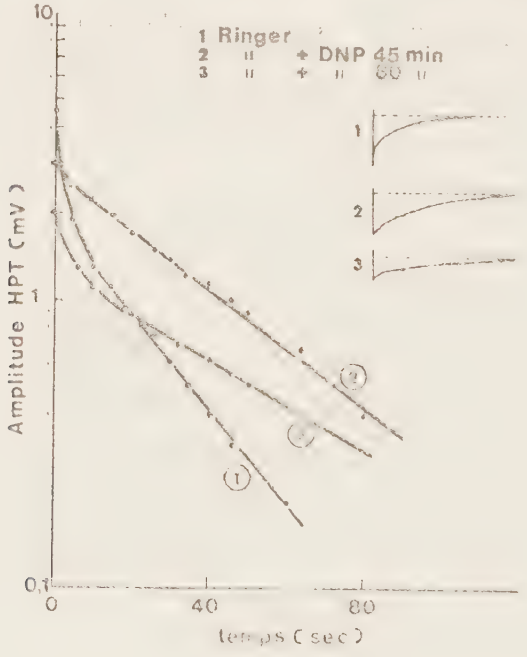
Ces résultats sont très difficiles à interpréter et interdisent toute évaluation des Q10 comme nous nous proposions de le faire. Ils suggèrent que plusieurs phénomènes doivent se superposer reflétant probablement des désordres d'origines diverses. Peut-être, comme nous l'avons déjà envisagé, un ralentissement du transport est-il impliqué par une insuffisance de la vitesse de synthèse du matériel énergétique utilisable par le système transporteur.

On notera que ces variations complexes ont été obser-



- Figure 31 -

Effets du lithium sur les constantes de temps de l'HPT. Après le lavage de la préparation par du Ringer lithium pendant 5 et 10 minutes, on observe une augmentation de la constante de temps T_2 avec le temps de passage du lithium. Expérience du 15.2.71.



- Figure 32 -

Effets du 2-4-DNP sur les constantes de temps de l'HPT. L'imprégnation de la préparation pendant 45 minutes (2) et 80 minutes (3) par une solution contenant 0,5 mM de DNP accroît la constante de temps de la phase lente de l'HPT. En présence de 2-4 DNP comme en présence de Li (fig.31), le décours de cette phase reste celui d'une exponentielle. Noter également que la phase initiale rapide de l'HPT est abolie.

vées sur toutes les préparations et que les phénomènes sont parfaitement mais très lentement réversibles. Bien que l'on ne puisse extraire de ces résultats des données quantitatives, on peut affirmer qu'ils ne peuvent en aucune façon rendre compte d'une hyperpolarisation post-tétanique qui résulterait d'un changement de perméabilité de la membrane passive. Dans ce cas en effet, on aurait attendu un allongement banal de la constante de temps et un Q10 de l'ordre de 2,8 (FRANKENHAEUSER et MOORE, 1963).

IV.5 - Les poisons agissent différemment sur les constantes de temps de l'HPT.

Poursuivant l'analyse du décours temporel de l'HPT, nous avons étudié successivement les effets du lithium, du 2-4-DNP, et ceux de l'ouabaïne. On a vu (fig. 21, 24 et 26) que ces trois agents abolissent l'HPT, c'est pourquoi leurs effets sur la constante de temps ont été étudiés à différents instants au cours de leur action.

Les figures 31, 32 et 33 montrent, en représentation semi-logarithmique, les effets du lithium, du 2-4-DNP et de l'ouabaïne respectivement.

L'examen des résultats révèle que le lithium et le DNP conduisent à des effets qualitativement identiques en ce sens que :

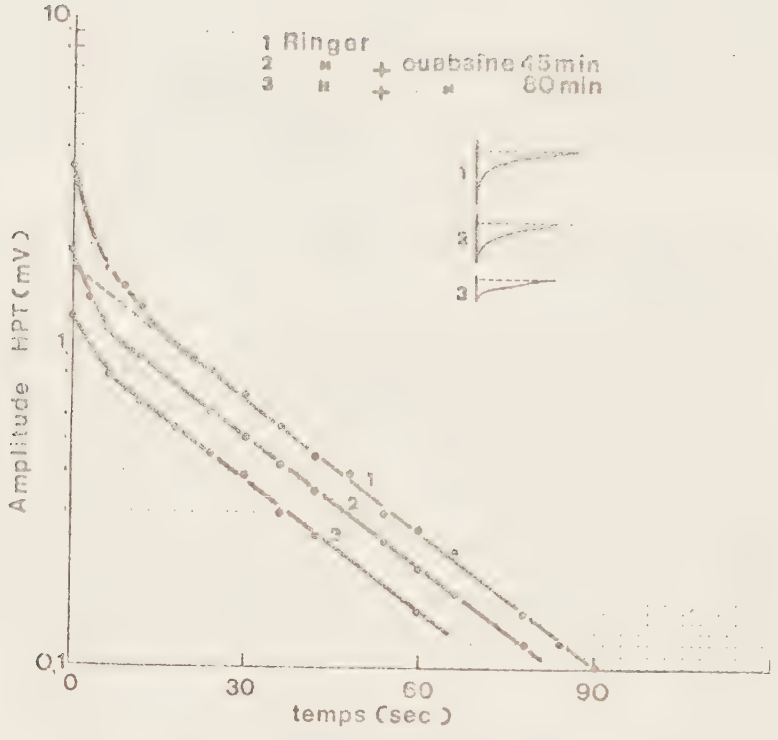
a/ - la phase initiale disparaît et ne peut plus être étudiée,

b/ - la constante de temps de la phase lente augmente avec le temps d'exposition à l'inhibiteur.

Cette deuxième phase reste néanmoins une exponentielle décroissante du temps.

L'ouabaïne a des effets très différents :

a/ - la phase initiale persiste jusqu'à la disparition totale de l'HPT.



- Figure 33 -

Effets de l'ouabaïne sur les constantes de temps de l' HPT. L'ouabaïne a été ajoutée à la concentration de 1 mM au Ringer normal.
Après 45 minutes (2) et 80 minutes (3) d'exposition à cette solution, la phase initiale de l'HPT persiste. Noter que la constante de temps T_2 reste inchangée bien que l'amplitude de l'HPT soit nettement réduite.

b/ - pendant une longue période, la constante de temps T_0 de la phase lente reste inchangée bien que l'HPT diminue en amplitude.

Interprétation des résultats.

On notera d'abord que pendant toute la durée d'action des poisons, le décours de la phase lente reste celui d'une exponentielle décroissante du temps contrairement à ce que nous avons observé dans le cas de l'abaissement de température.

On remarquera que dans ce dernier cas, on peut admettre que très rapidement, toutes les fibres de la préparation sont soumises à peu près au même moment à la solution refroidie.

Dans le cas d'agents diffusant lentement dans la préparation, deux possibilités doivent être envisagées :

A/ - les effets sont immédiats et abolissent brutalement le transport au niveau de chaque axone ou site membranaire de sorte que la variation d'amplitude de l'HPT va traduire, en fait, la réduction progressive du nombre de fibres développant une HPT. Celles qui ne sont pas encore atteintes par le poison continuent à produire l'HPT dans des conditions que nous pouvons considérer comme normales, c'est à dire sans changement de la constante de temps.

Seule l'ouabaïne, parmi les quatres agents inhibiteurs étudiés peut rendre compte de ces modalités d'action.

Cette constatation est en bon accord avec la plupart des données de la littérature selon lesquelles l'ouabaïne bloque, par inhibition compétitive, la prise en charge du potassium par le transporteur sur la face externe de la membrane (directement accessible par diffusion).

On peut donc dire que l'ouabaïne bloque par tout ou rien les sites transporteurs de chacun des axones inclus dans la préparation.

B/ - Les effets sont progressifs et dépendent de: - la diffusion de solution jusqu'à la membrane axonale, -l'entrée dans le compartiment intra-cellulaire, - l'action plus ou moins directe et éventuellement progressive de l'agent sur les systèmes transporteurs de chaque axone.

Telle peut être l'action du 2-4-DNP qui bloque la synthèse d'ATP et dont la vitesse d'action sur le transport est subordonnée à l'importance des réserves pré-existantes dans chaque axone.

Tel peut être aussi l'effet du LiCl dont les modalités d'action sont complexes et semblent dépendre de la présence de ce cation sur la face externe de la membrane où il agirait en entrant en compétition avec les ions K^+ (BAKER et MANIL, 1968; BAKER et WILLIS, 1969) et de sa présence sur la face interne de la membrane (KEYNES et SWAN, 1959; RUSH et RENSHAW, 1968; THOMAS, 1969) où le Li ne serait pas capable d'activer l'ATPase sodium dépendante.

Si l'on tient compte du temps de diffusion de ces agents (2-4 DNP et lithium) dans l'espace extra-cellulaire puis intra-cellulaire et de la désynchronisation obligatoire qui doit en résulter entre les différents axones, il apparaît en définitive assez étonnant que le décours de l'HPT reste celui d'une exponentielle sauf si l'action sur les sites externes est dominante. Corrélativement, on comprend peut-être mieux les déviations du décours temporel par rapport à une exponentielle observées à basse température. Ces déviations peuvent résulter en très grande partie du fait que la préparation est de type pluricellulaire et que chaque axone ne dispose pas nécessairement, au même instant, des mêmes réserves énergétiques. Nous convenons cependant que ces interprétations sont spéculatives sur la seule base de nos résultats actuels.

Quoi qu'il en soit, on peut reconnaître que l'effet des inhibiteurs tels que le froid, le lithium et le 2-4 DNP est de prolonger la durée de fonctionnement de la pompe pour un accroissement donné de $[Na]_i$. Ceci peut s'expliquer en admettant qu'avant d'être bloquée, la pompe des axones empoisonnés expulse

moins de sodium par unité de temps.

L'inhibition produite par l'ouabaïne serait de nature différente et résulterait d'une réduction du nombre de transporteurs membranaires utilisables et non d'une diminution de la vitesse de tranport.

Interprétation des deux constantes de temps.

Nous pensons avoir démontré que les deux constantes de temps mises en évidence dans les conditions normales correspondent à deux phénomènes indépendants se superposant au cours du temps pendant l'hyperpolarisation post-tétanique.

On notera d'entrée que la signification de la phase initiale est certainement très difficile à découvrir puisque RANG et RITCHIE n'ont pas, à ce jour, apporté d'interprétation de ce phénomène (observé également sur les nerfs amyéliniques de Mammifères) alors qu'ils annonçaient en 1968 que ce problème faisait partie de leurs préoccupations.

Il ne fait aucun doute par contre que la phase lente, sensible à la durée des tétanos, reflète l'activité de la pompe Na-K. On peut d'ailleurs penser qu'elle en est une réplique assez fidèle puisque, si l'on fait abstraction de la durée de la phase rapide (4 à 6 secondes), on peut déduire de la figure 27 que la phase lente est proportionnelle à la durée des tétanos.

On peut considérer, comme RANG et RITCHIE l'ont fait pour la réponse activée par le potassium, que l'inverse de la constante de temps (ici: $1/T_2$) est l'expression de la vitesse de pompage du système transporteur définie dans des conditions standard (pour une préparation donnée, dans un milieu de composition ionique constante et après des tétanos de durée et fréquence constantes).

Ces remarques faites nous essayerons d'envisager ici quelques interprétations possibles de la phase initiale (HPT_1). Comme on va le voir, sa signification dépend de celle que l'on

donne de la phase lente (EPT_2).

Nous discuterons donc ce problème en envisageant deux grandes possibilités :

a/ - L'EPT_2 correspond au transport net de charges effectué par une véritable pompe électrogène.

b/ - L'EPT_2 est le reflet indirect (mais fidèle) de l'activité d'une pompe neutre ou dont le caractère électrogénique n'est pas décelable.

Dans les deux cas, la phase initiale peut représenter une "amplification" transitoire et apparente de l'activité de la pompe; mais on peut observer que, dans les deux cas aussi, la phase lente peut résulter d'un bridage du transport après la phase rapide.

Compte-tenu de la signification que nous donnons à la phase lente, on doit attendre que celle-ci débute au cours du tétanos et non après celui-ci comme les enregistrements semblent le montrer. En effet, l'activité de la pompe doit s'installer, en principe, dès que la concentration intracellulaire en sodium dépasse un niveau critique (THOMAS, 1969) qui doit correspondre à la concentration limite tolérable pour un type cellulaire considéré. Il n'existe donc aucune raison pour que l'activité du système transporteur soit subordonnée à la fin d'un tétanos.

On observera cependant que la fin du tétanos coïncide avec le brusque retour des perméabilités de la membrane passive à leur niveau de repos; elle correspond aussi au moment où l'approvisionnement continu du compartiment intra-cellulaire en sodium cesse brusquement, comme cesse aussi l'accroissement de la concentration extra-cellulaire en potassium. On peut donc attendre que la phase initiale de l'HPT dépende de l'arrêt de la stimulation itérative.

Ces considérations nous incitent à penser que l'activité électrique de la membrane passive masque l'activité de la pompe pendant le tétanos.

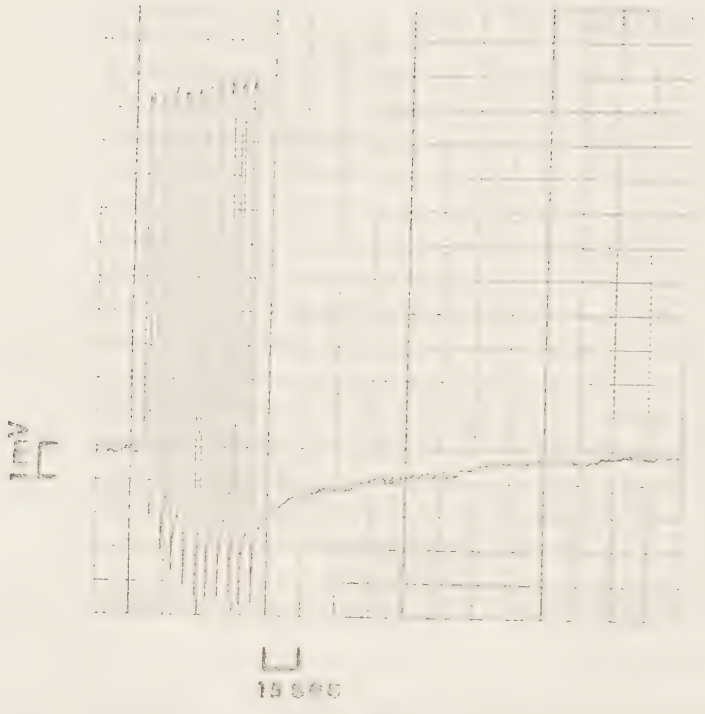
La démonstration peut en être fournie par une expérience qui permet de révéler, par un artifice, l'activité de la pompe pendant un tétanos. Elle consiste à interrompre l'excitation pendant 3 secondes, toutes les cinq secondes au cours d'un tétanos de longue durée. Cette interruption permet de voir la progression continue de l'hyperpolarisation (fig. 34) décrite par la courbe enveloppe des maxima (pic des HPT_1).

On peut noter que la courbe qui joint le niveau de départ de chacun des tétanos successifs représente pratiquement la variation de la phase lente puisque la phase initiale (HPT_1) est habituellement terminée quelques secondes après le tétanos.

Une analyse comparative montre qu'après le premier tétanos partiel, ces deux courbes sont homothétiques. Ceci peut être expliqué -soit par une augmentation apparente et transitoire de l'activité de la pompe juste à la fin du tétanos (changement de la résistance de membrane) - soit parce que l'HPT_2 correspond à une réduction importante de l'activité de la pompe après la phase initiale.

Si la pompe est électrogène, une amplification apparente de son activité ne peut survenir que si la résistance de membrane passive est temporairement plus élevée à la fin du tétanos (HPT_1) que pendant l'HPT_2.

Si l'HPT_2 représente l'activité de la pompe via les changements de la concentration extra-cellulaire en potassium



- Figure 34 -

Enregistrement du potentiel de membrane en fonction du temps pendant et après stimulation de la préparation pendant 2 sec toutes les 5 secondes.
On observe ainsi le développement progressif d'une hyperpolarisation au cours d'un tétanos régulièrement interrompu. Cette hyperpolarisation atteint son amplitude maximum en une vingtaine de secondes. Après la première salve la courbe joignant les maxima des HPT successives et celle passant par la niveau de départ de chaqu' tétanos sont approximativement homothètiques.

(et donc, de la perméabilité au potassium), une augmentation apparente de l'activité du système transporteur ne peut résulter que d'un accroissement de perméabilité, ce qui correspondrait à une résistance de membrane plus petite pendant l'HPT_1 que pendant l'HPT_2.

En fait, il est difficile de prévoir si la résistance augmente ou diminue à la fin d'un tétanos de longue durée car on sait (NEVES, 1961) qu'après un tétanos de courte durée (100 msec) P_K est [illegible] et on sait aussi qu'après une dépolarisation continue (SCHWARTZ et VOGEL, 1971) ou itérative(BERGMAN, 1970), une inactivation de P_K, incomplète, peut se développer. Nous considérons donc que les deux hypothèses peuvent être retenues sur la base de nos résultats actuels.

Que la pompe soit électrogène ou non, deux autres facteurs peuvent également rendre compte de la phase initiale :

a/ - Pendant le tétanos, la concentration intra-cellulaire en sodium au voisinage de la face interne de la membrane axonale, est très élevée et l'activité de la pompe est maximale (fig.35A).

L'arrêt de la stimulation tétanique correspond donc à la cessation brutale d'un apport continu et massif de sodium dans un "compartiment" intra-cellulaire juxta-membranaire. La pompe, très active à cet instant, épuise donc d'autant plus rapidement ce compartiment virtuel, que ce dernier est petit d'une part et qu'il n'est plus alimenté d'autre part.

A la fin de la phase initiale (fig. 35B) la concentration sous-membranaire devient égale à la concentration moyenne dans l'axoplasme (ce qui revient à dire que le "compartiment" sous-membranaire a cessé d'exister).

Le compartiment axoplasmique, beaucoup plus volumineux est donc vidé (fig. 35C) plus lentement, à une vitesse d'expulsion modérée. Dans une fibre myélinisée, la surface de membrane limitée au noeud de Ranvier, est très petite par rapport au volume axoplasmique. On peut donc comprendre que la phase initiale, qui dépend finalement de la concentration en sodium au voisinage

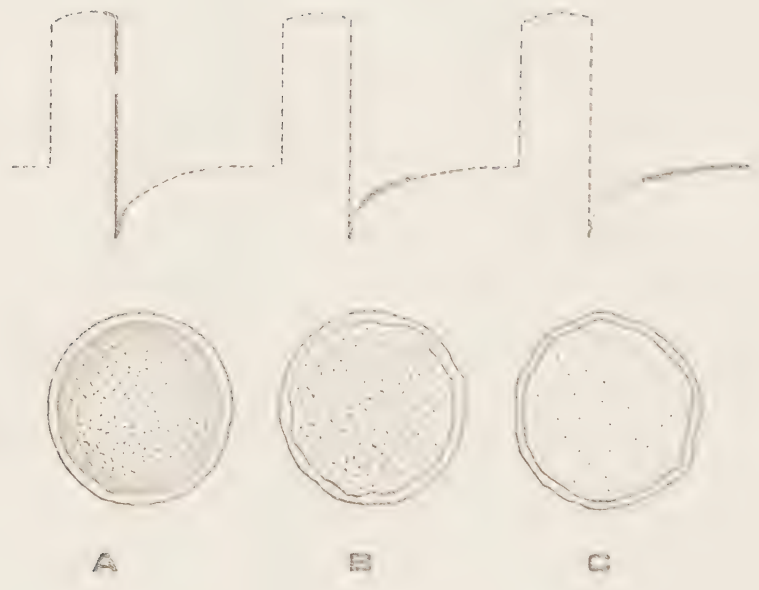


Schéma représentant l'UPT à trois instants différents (traits épais) et (rangée inférieure) la répartition supposée du sodium dans un axone participant à la génération de l'UPT.
En A : juste à la fin du tétanos [illegible] est très élevé au voisinage de la face interne de la membrane axonale. Cet état correspond au moment où l'activité de la pompe est maximum [illegible].
En B : [illegible] expulse une grande partie du sodium accumulé dans [illegible]. La répartition est donc homogène.
En C : [illegible].

immédiat de la face interne de la membrane, soit approximativement constante même si, toutes choses égales par ailleurs, la durée du tétanos augmente. Par contre, la quantité de sodium emmagasinée dans le volume axoplasmique est proportionnelle à la durée du tétanos. Il s'en suit que la phase initiale et la phase lente sont pratiquement indépendantes l'une de l'autre.

Si l'hypothèse est correcte, on peut prévoir que le seul facteur susceptible de faire varier notablement la phase initiale indépendamment de la phase lente, soit la concentration locale de sodium entretenue au voisinage de la membrane pendant un tétanos. Tout facteur susceptible de faire varier P_{Na} ou la d.d.p. $E - E_{Na}$ doit donc conduire à une variation de la phase initiale. Il est permis de penser qu'un inhibiteur du métabolisme ou du transport actif puisse exercer une action apparemment plus prononcée sur la phase initiale si celle-ci correspond au régime d'activation maximum du système transporteur.

b/ - La deuxième possibilité que l'on puisse envisager procède d'un raisonnement analogue dans lequel sont considérées les variations de concentration en potassium dans l'espace extra-cellulaire.

L'espace perinodal en effet, pendant un tétanos, est continuellement alimenté en potassium par la sortie passive de l'axoplasme accrûe par l'excitation. Quelle que soit l'activité de la pompe, on peut admettre que pendant cette période, $[K]_e$ est largement suffisant pour assurer le fonctionnement du système transporteur Na-K. Ceci est d'ailleurs démontré par les expériences que nous avons faites dans le Ringer sans potassium (c.f. section III.1).

A la fin du tétanos, l'activité de la pompe est maximale pour les raisons que nous avons précédemment envisagées, alors que cesse brusquement l'apport de potassium dans l'espace perinodal. La pompe, très active à cet instant, abaisse donc fortement $[K]_o$ dans l'espace peri-membranaire restreint (d'où, accroissement de E_K). Cette diminution, si elle est importante,

devient le facteur limitant de l'activité du système transporteur.

Dans cette hypothèse, la phase rapide résulterait donc d'une autorégulation de l'activité de la pompe par sa "consommation" de potassium à partir d'un espace extra-cellulaire qui brusquement, n'est plus alimenté,

On voit en définitive que plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer l'origine des deux phases de l'hyperpolarisation post-tétanique. Leur choix dépend en grande partie de l'interprétation qui peut être donnée de l'HPT dans son ensemble. Aussi, tenterons-nous, dans la série d'expériences suivantes de savoir si l'hyperpolarisation post-tétanique représente :

- la variation de E_K créée par la pompe et détectée par la membrane passive;

- ou le caractère électrogénique réel d'une pompe Na-K assurant un transport net de charges d'une face à l'autre de la membrane.

V - L'AMPLITUDE DE L'HPT DEPEND DE LA PERMEABILITE AU POTASSIUM DE LA MEMBRANE PASSIVE.

La distinction entre une HPT résultant de la variation post-tétanique de E_K et une HPT résultant de l'activation d'une pompe électrogénique est d'autant plus difficile à établir que l'une des possibilités n'exclut pas nécessairement l'autre. Ainsi, une pompe électrogénique peut créer une hyperpolarisation transitoire de la membrane en raison de son caractère électrogénique mais aussi en faisant varier la valeur de E_K par abaissement de $[K]_e$.

Peu d'expériences permettent de trancher avec sûreté entre les deux possibilités ou de faire la part qui revient à chacune d'elles.

Si la pompe est électrogénique, et si l'HPT résulte

dece caractère, on doit attendre que tout accroissement de la résistance membranaire passive au niveau du potentiel de repos produise une augmentation de l'amplitude de l'HPT. C'est ainsi que, substituant de l'isethionate de sodium au NaCl du liquide de Locke, RANG et RITCHIE (1968) ont pu mettre en évidence une augmentation de dix fois l'amplitude de l'HPT et des réponses activées par le potassium sur le nerf vague de Mammifères. Toutefois, ces auteurs observent que s'ils réduisent la durée du stimulus de façon à ne recruter que les fibres myélinisées du groupe B, l'HPT ne subit aucune variation, ce qui indique que la P_{Cl} des fibres myélinisées est nettement plus faible que celle des fibres amyéliniques.

Il était donc intéressant de réaliser sur notre préparation des expériences similaires.

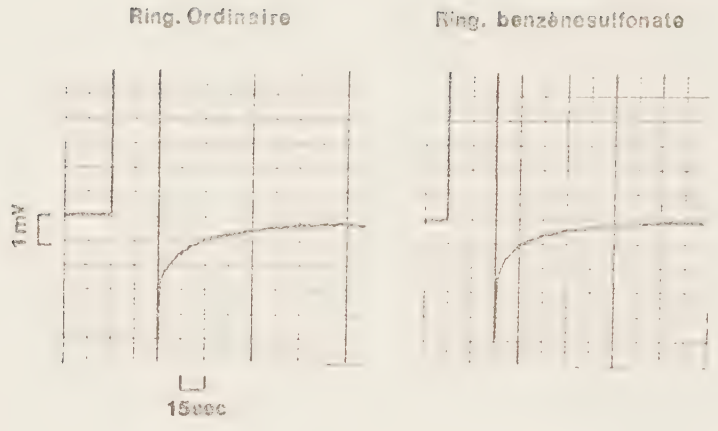
V.1 - L'HPT du nerf sciatique est insensible à la substitution d'[illegible] au [illegible] du Ringer.

Ces expériences ont consisté à comparer l'amplitude de l'HPT obtenue dans les conditions normales (Ringer) à celle qui résultait d'un tétanos identique imposé à la préparation dans une solution de Ringer dont la totalité du NaCl avait été remplacée, soit par de l'isethionate de sodium, soit par du benzène-sulfonate de Na.

Les expériences ont montré (fig. 36) que l'amplitude de l'HPT n'est pratiquement pas modifiée par le changement de solution. Lorsqu'une variation se produit, elle peut être une légère augmentation ou une faible diminution.

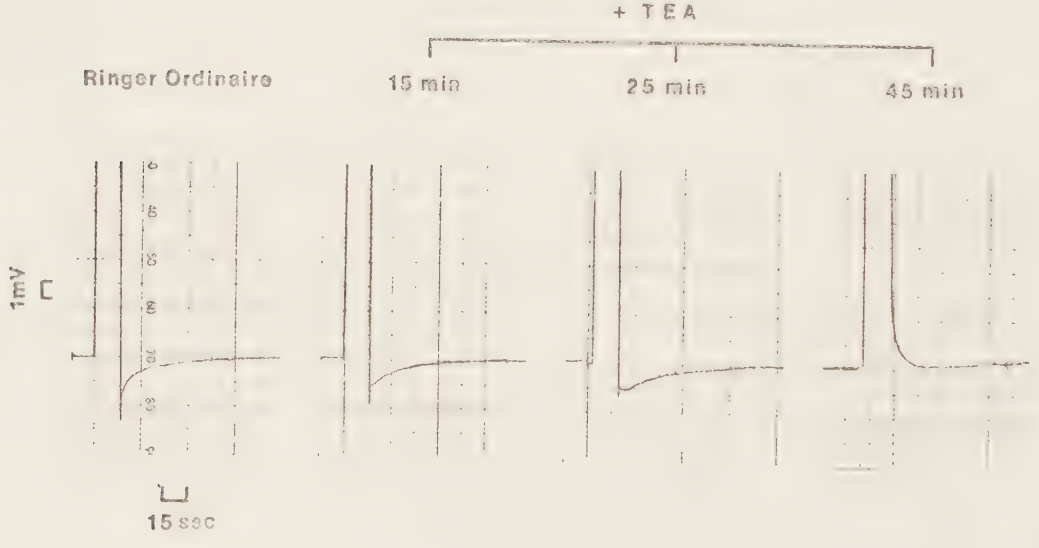
Nous considérons donc ces résultats expérimentaux (11 expériences) comme non significatifs.

On observera néanmoins que SCHMIDT (1964) a noté, sur le faisceau du nerf tibial de Grenouille, une augmentation de la résistance de membrane lorsque le sulfate ou le méthyl-sulfate de sodium étaient substitués au NaCl du Ringer.



- Figure 36 -

Absence d'effet des anions imperméants.
La substitution de benzènesulfonate de Na au NaCl du Ringer ne modifie pas l'amplitude de l'HPT bien que le lavage ait été prolongé au delà d'une trentaine de minutes.



- Figure 37 -

L'HPT enregistrée dans le Ringer ordinaire après une stimulation à 150 Hz pendant 15 secondes, disparaît en présence de tetraethylammonium (5 mM). Elle est remplacée, après un lavage prolongé par une post-dépolarisation résultant de la réduction de P_K par le TEA.

Ces variations, vers les hauts niveaux du potentiel de membrane, sont de l'ordre de +20%. Le fait que l'amplitude de l'HPT ne varie pas dans nos conditions expérimentales n'est donc pas un argument qui plaide en faveur d'une pompe électrogénique.

Compte-tenu des obervations de RANG et RITCHIE, nos résultats tendent à confirmer que l'HPT que nous mesurons se développe effectivement sur les fibres myélinisées du nerf sciatique.

Plus concluantes seront sans doute les expériences suivantes.

V.2 - L'HPT est abolie par le tétra-éthylammonium.

Le tétra-éthylammonium (TEA) est un inhibiteur spécifique de la perméabilité au potassium de la membrane des axones myélinisés (SCHMIDT et STAMPFLI, 1966; KOPPENHOFER, 1967; HILLE, 1967). Par ailleurs le potentiel de repos de la fibre myélinisée dépendant en grande partie de la perméabilité au potassium, on peut attendre qu'une inhibition par le TEA produise :

a/ - un accroissement d'amplitude de l'HPT si la pompe est électrogène.

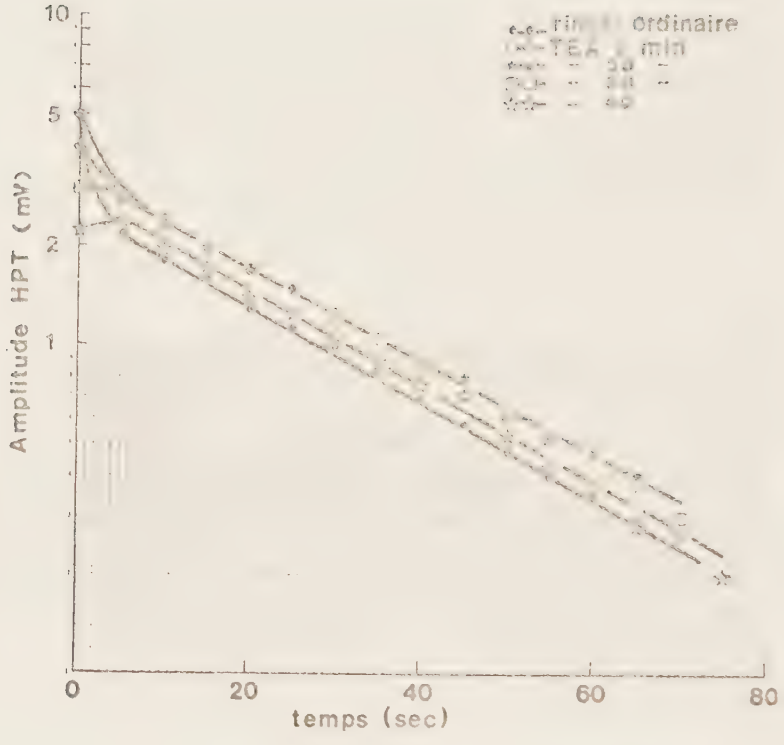
b/ - une abolition de l'HPT si celle-ci résulte de la variation de E_K créée par la pompe.

En d'autres termes, deux effets inverses, à première vue décisifs, peuvent être attendus du TEA.

Les expériences ont donc consisté à comparer les amplitudes des HPT obtenues dans le Ringer ordinaire et dans la même solution à laquelle 5 mM de TEA avaient été ajoutées.

Les résultats sont parfaitement nets : - l'HPT est totalement abolie par le TEA et l'on peut observer (fig. 37) un très net ralentissement de la repolarisation membranaire à la fin du tétanos, phénomène qui est en accord avec une réduction de P_K.

Nous avons toujours noté que le tétra-éthylammonium



- Figure 38 -

Effet du TEA sur les constantes de temps de l'HPT.
Représentation en coordonnées semi-logarithmiques des variations du potentiel de membrane pendant l'HPT en fonction du temps - dans le Ringer ordinaire, puis dans le Ringer contenant du TEA (1 mM) après 5, 20, 30 et 40 minutes de lavage par cette solution. Noter que la constante de temps T_2 reste inchangée alors que la phase initiale de l'HPT (HPT_1) disparaît. Expérience du 3.2.71.

agit lentement, ce qui traduit une diffusion restreinte de ce cation dans le faisceau nerveux.

Il est intéressant de constater (fig. 38) que la constante de temps T_2 est inchangée par le TEA. Comme nous l'avons souvent observé, la phase initiale de l'HPT disparaît bien avant la phase lente de sorte qu'il n'est pas possible d'évaluer les variations de T_1.

Interprétation et discussion des résultats.

On serait tenté sur la base de ces résultats de conclure que l'HPT procède d'une variation de E_K créée par la pompe et mesurée par l'intermédiaire d'une membrane passive se comportant comme une électrode au potassium. Dans ces conditions en effet, une inhibition de P_K doit abolir l'HPT.

Cette interprétation, néanmoins, doit-être accueillie avec certaines réserves.

1°/ - Bien que tous nos résultats antérieurs ne puissent s'accorder avec l'hypothèse selon laquelle l'HPT résulte d'un accroissement de P_K, l'abolition que nous observons en présence de TEA peut être considérée comme un très fort argument en faveur de cette hypothèse.

2°/ - Si l'on attend que l'amplitude de l'HPT augmente en présence de TEA dans le cas où l'HPT traduit le caractère électrogénique d'une pompe Na-K, deux raisons peuvent néanmoins contribuer à sa réduction voire-même à sa disparition .

a/ - Qu'elle soit électrogène ou non, la pompe Na-K absorbe le potassium de l'espace extra-cellulaire d'autant plus fortement que l'entrée de sodium dans l'axoplasme est importante. En présence de TEA, la phase de repolarisation de chaque potentiel d'action est très ralentie (SCHMIDT et STAMPFLI, 1965), de sorte que la quantité de sodium pénétrant dans l'axoplasme est très probablement plus grande que dans le Ringer normal.

On doit donc attendre que l'activité de la pompe soit accrûe et par suite, que le milieu extra-cellulaire au voisinage de la membrane soit très appauvri en potassium.

Dans les conditions normales, tout porte à penser que la sortie passive de potassium pendant le tétanos, maintient une concentration en ions K^+ suffisante dans l'espace extra-cellulaire. Cet approvisionnement n'existant plus en présence de TEA, on peut parfaitement imaginer que $[K]_e$ devient nul et, partant, que la pompe Na-K est bloquée.

b/ - Bien que RANG et RITCHIE (1968) et DEN HERTOG et RITCHIE (1969) aient mentionné que le TEA n'a aucun effet sur la pompe Na-K des fibres amyéliniques de Mammifères, un doute peut subsister cependant.

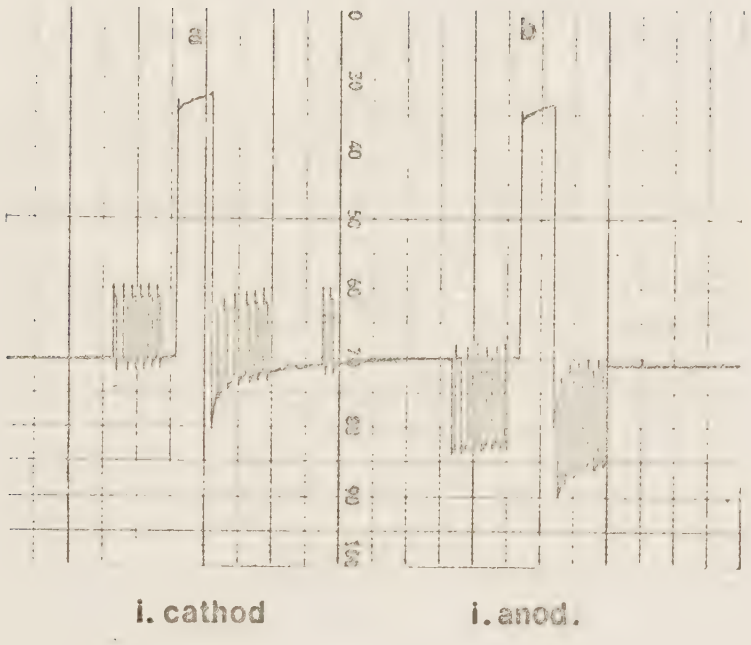
En effet, SACHS (1967) et SACHS et CONRAD (1968) ont pu montrer que les flux actifs couplés de sodium et potassium des hématies sont inhibés par le TEA. L'effet de cet agent résulterait, selon les auteurs, d'une inhibition compétitive entre le TEA et le potassium extra-cellulaire au niveau du transporteur.

On notera néanmoins que cet effet a été obtenu en apportant au milieu extra-cellulaire 144 mM de TEA, ce qui est une concentration 30 fois plus élevée que celle qui était suffisante pour bloquer l'HPT sur nos préparations. Il n'est donc pas évident que l'action du TEA sur le nerf sciatique puisse être comparée à celle que SACHS et CONRAD ont décrite sur le globule rouge.

L'ensemble de ces considérations nous a conduite à entreprendre une série d'expériences destinée à lever les objections formulées ci-dessus.

V.3 - La résistance de membrane augmente pendant l'HPT.

Si l'HPT résultait d'un accroissement de P_K comme peut le laisser supposer l'effet du TEA, la résistance de membrane doit être plus basse pendant l'HPT qu'au repos.



- Figure 39 -

Etude de la variation de résistance de membrane au repos (avant la dépolarisation tétanique) et pendant l'HPT, par application d'impulsions de courant constant dépolarisant et hyperpolarisant. Noter que les variations de potentiel obtenues sont toujours plus grandes pendant l'HPT qu'au potentiel de repos. Expérience du 9.3.70.

Les expériences suivantes ont donc consisté à mesurer, dans le Ringer ordinaire, la résistance de membrane par la méthode des "square pulses" (impulsions de courant constant), - au niveau du potentiel de repos, avant un tétanos, - pendant l'HPT.

Les impulsions de courant, de même intensité, ont été appliquées pendant 1 à 2 secondes dans la direction anodique puis cathodique ou vice -versa. La figure 39 illustre une expérience de ce genre.

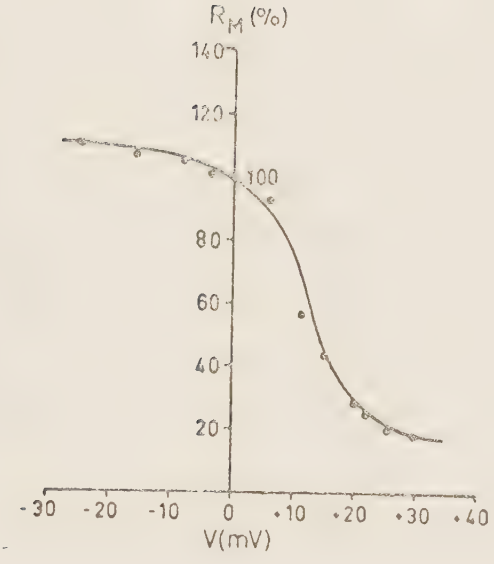
Il apparaît clairement que les variations de potentiel créées par les impulsions cathodiques ou anodiques sont plus amples pendant l'HPT qu'au repos avant le tétanos.

Ainsi, pour 9 expériences de ce type, il est apparu que l'accroissement moyen de la résistance de membrane pendant l'HPT (3 à 5 secondes après la fin du tétanos) est de:

$+ 16\% \pm 4,5$ (moyenne et erreur standard)

Un tel résultat ne peut donc, en aucune façon, être expliqué par un accroissement post-tétanique de perméabilité au potassium. Nous trouvons donc dans ces données un argument supplémentaire pour affirmer que l'HPT résulte de l'activation d'une pompe Na-K, mais on retiendra cependant que nous n' avons pu, dans ces expériences, explorer la résistance de membrane dans les deux premières secondes après la fin du tétanos. On ne peut donc exclure qu'elle soit plus petite, dans ces premiers instants, qu'au repos.

Il était intéressant de savoir si l'augmentation de résistance membranaire constatée résulte directement du tétanos conditionnant (inactivation de P_K par exemple) ou si elle procède du changement de potentiel (HPT) créé par la pompe. On sait en effet que la conductance globale des membranes excitables décroît avec l'hyperpolarisation et augmente avec la dépolarisation. Il s'en suit que la résistance de membrane (Rm) varie en sens inverse (LÜTTGAU, 1960; SCHMIDT, 1964; fig. 40).



- Figure 40 -

Réistance de membrane (Rm) d'un faisceau nerveux (nerf tibial de Grenouille) en fonction de la variation du potentiel de membrane (V). La valeur de V = 0 est le potentiel de repos, les dépolarisations sont positives.
La résistance de membrane est exprimée en % de la valeur normale ou potentiel de repos. (D'après SCHMIDT, 1964).

Nous avons donc comparé, toujours à l'aide d'impulsions de courant constant, l'accroissement de la résistance de membrane pendant l'HPT (2 à 5 secondes après la fin du tétanos) à la variation de Rm lorsque la membrane, au repos, est hyperpolarisée par un courant constant.

Nous avons trouvé, pour 4 préparations différentes une variation de Rm de :

$+ 15,6 \pm 5,2\%$ pendant l'HPT

et de :

$+ 13,5 \pm 6,1\%$ au repos, à même potentiel que pendant l'HPT

Compte tenu de la dispersion des résultats, on ne peut pas dire que la différence entre ces deux valeurs soit significative. Nous concluons que le léger accroissement de résistance mis en évidence pendant l'HPT ne procède pas directement des effets du tétanos mais doit être considéré comme un accroissbanal de résistance dû à la variation de potentiel (HPT) créée par l'activation de la pompe.

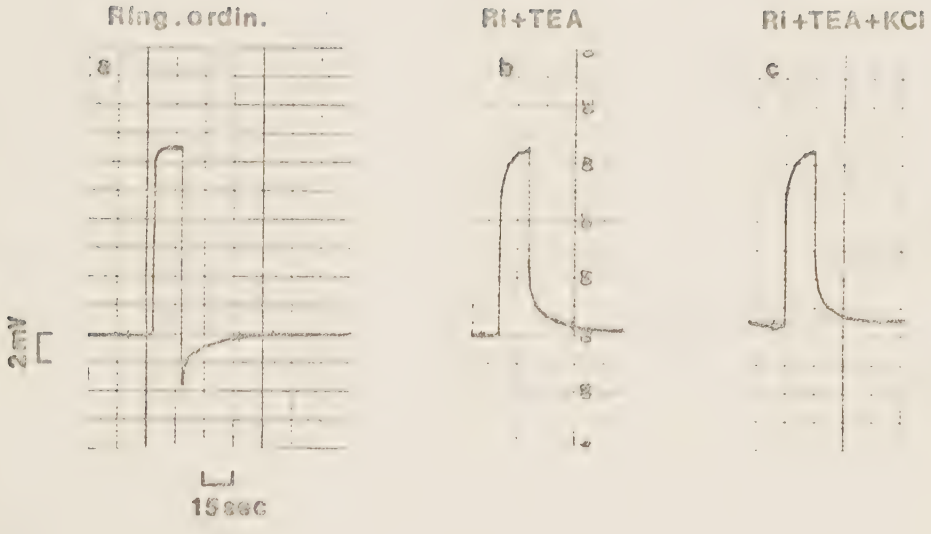
Nous estimons donc que la première objection formulée dans les pages précédentes est levée.

V.4 - l'HPT abolie par le TEA n'est pas restaurée par l'accroissement de $[K]_e$.

La deuxième objection qui devait être levée était que la pompe pouvait être inhibée en présence de TEA en raison d'un défaut de potassium dans le milieu extra-cellulaire.

Des expériences identiques à celles qui ont été décrites précédemment (section V.2) ont été refaites.

Lorsque l'HPT est abolie par le TEA, soit 20 à 30 minutes après le début de l'expérience, une solution de Ringer enrichie en KCl (10 mM et quelquefois 20 mM) et contenant comme la précédente 5 mM de TEA et 112 mM de NaCl, était appliquée à



- Figure 41 -

L'addition de potassium au Ringer ne rétablit pas l'HPT abolie par le TEA.
a/ - enregistrement de l'HPT après stimulation tétanique dans le Ringer normal
b/ - abolition de l'HPT par 5 mM de TEA.
c/ - addition de 10 mM de KCl au Ringer + TEA. Expérience du .13.11.70.

la préparation afin de rétablir une concentration en potassium extra-cellulaire supposée insuffisante.

Comme le montre la figure 41, le potassium rajouté au TEA ne permet pas une restauration de l'HPT. On peut donc conclure que l'abolition de l'HPT par le TEA ne peut résulter seulement d'une insuffisance de $[K]_e$ pendant le tétanos. Un autre phénomène est donc en cause et l'on est très fortement tenté de penserque l'HPT résulte d'une variation de E_K créée par la pompe et détectée par la membrane passive perméable au potassium. Si tel est le cas, une corrélation linéaire doit exister entre la durée du potentiel d'action et l'amplitude de l'HPT pendant l'application de TEA.

V.5 - La durée du potentiel d'action augmente avant que ne diminue l'HPT pendant l'application de TEA.

Chercher une corrélation entre la durée du potentiel d'action et l'amplitude de l'HPT peut paraître absurde à première vue.

En réalité, on peut considérer que la durée du potentiel d'action est un bon indice de la réduction de perméabilité au potassium par le TEA (voir SCHMIDT et STAMPFLI, 1965; VIERHAUS et ULBRICHT, 1971). On peut donc s'attendre, si le TEA agit progressivement et différemment sur la pompe (SACHS et CONRAD, 1968) et sur la membrane passive, à une désynchronisation entre la variation d'amplitude de l'HPT et celle de la durée du potentiel d'action. Par contre, si l'HPT résulte d'une variation de P_K ou, si elle représente l'activité de la pompe via les variations de E_K, on doit attendre une variation concomitante (et donc une corrélation) de la durée du potentiel d'action et de l'amplitude de l'HPT.

Pour faire cette analyse, nous avons exploité la lenteur de diffusion du TEA dans le faisceau nerveux, ce qui a permis de mesurer simultanément, et à différents instants pendant une trentaine de minutes, la durée du potentiel d'action (photo-

graphie sur l'oscilloscope) et l'amplitude de l'HPT (enregistrée sur le scripteur potentiométrique).

La durée du potentiel d'action (fig. 42) était mesurée entre la phase de dépolarisation et la phase de repolarisation du potentiel d'action, à un niveau de potentiel correspondant à une dépolarisation de 20 mV.

L'expérience montre toujours que la durée du potentiel d'action s'accroît dès l'application de la solution de TEA puis atteint progressivement une valeur maximale en une trentaine de minutes (fig. 43).

L'amplitude de l'HPT ne commence à diminuer qu'une quinzaine de minutes après l'application de la solution de TEA.

Tout se passe donc comme si le TEA agissait avec une vitesse différente sur la durée du potentiel d'action et sur l'HPT.

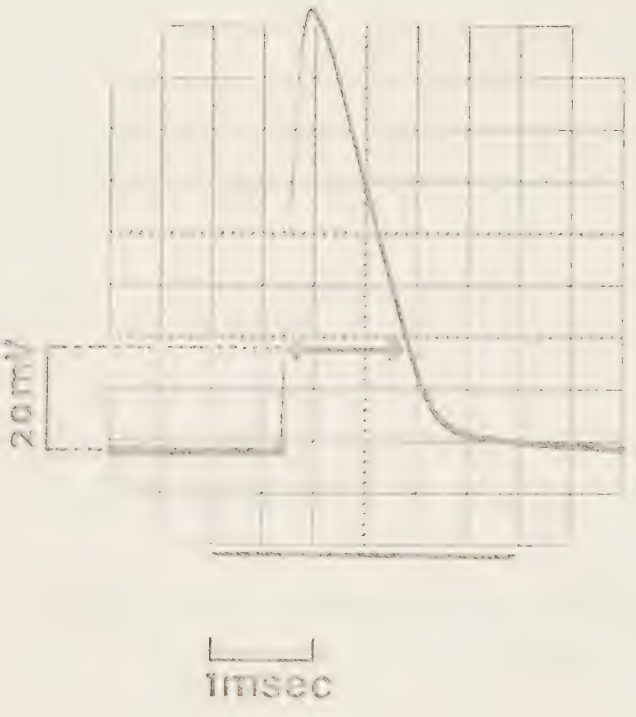
Nous avions interprété ce résultat (BERGMAN, 1972) en admettant, d'une part une action lente du TEA sur le transport actif (analogue à celle qui a été décrite par SACHS et CONRAD sur les hématies), d'autre part, une action directe et rapide de cet agent sur la perméabilité au potassium de la membrane passive.

Nous étions amenée à conclure :

1/ - que nos résultats démontraient que l'HPT ne pouvait résulter d'un accroissement de P_K,

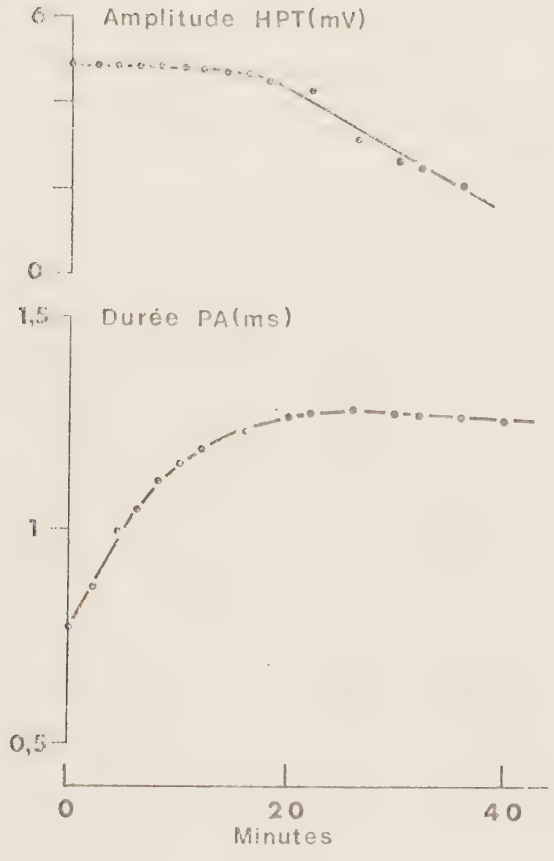
2/ - que si P_K était bloquée alors même qu'une HPT quasiment inchangée subsistait après une quinzaine de minutes d'application du TEA (voir fig. 43), l'HPT ne pouvait représenter la variation de E_K créée par la pompe mais le caractère électrogénique de cette dernière.

Cette interprétation (2°) n'était cependant pas satisfaisante car nous n'expliquions pas qu'une HPT semblable à celle que nous étudions sur le nerf entier ne soit pas observable sur la fibre myélinisée isolée (MEVES, 1961).



- Figure 42 -

Mesure de la durée du potentiel d'action (PA). Ici, le PA est enregistré après 30 minutes de lavage par le TEA. Sa durée est mesurée entre la phase initiale de dépolarisation et celle de la repolarisation à un niveau de dépolarisation correspondant à une vingtaine de mV. Pour cette préparation, la durée du PA est évaluée à 1,2 msec.



- Figure 43 -

Désynchronisation entre l'effet du TEA sur l'amplitude de l'HPT et sur la durée du potentiel d'action.
On a porté sur ce graphique l'amplitude de l'HPT (ordonnées) et la durée du PA en fonction du temps d'application du TEA. Le TEA est appliqué au temps 0. La durée du PA augmente dès cet instant. En revanche l'amplitude de l'HPT ne commence à décroître que plus tardivement. Ces courbes ont été tracées d'après la moyenne des résultats obtenus sur 12 préparations différentes.

Une autre interprétation fondamentalement différente, nous a été proposée par ASCHER. Elle a le mérite d'être en accord avec tous nos résultats expérimentaux et permet surtout d'expliquer la différence de comportement entre le faisceau de fibres myélinisées et la fibre isolée.

Pour ASCHER, l'HPT du nerf sciatique peut effectivement résulter de l'activation d'une pompe Na-K. Elle ne représenterait cependant pas le caractère électrogène du système transporteur mais l'augmentation de E_K résultant de l'activation de la pompe.

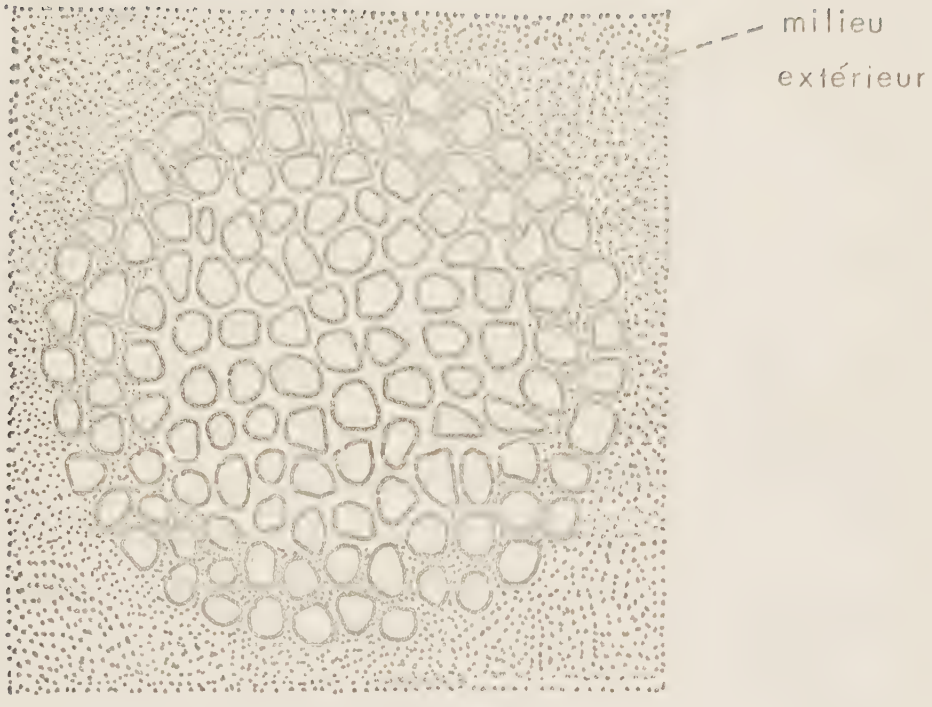
La fibre nerveuse isolée, baignée dans un milieu constamment renouvelé, disposerait en permanence d'une quantité suffisante de potassium de sorte que l'activation de sa pompe (électrogénique ou non) n'aboutirait jamais à un abaissement décelable de $[K^+]_o$.

Dans le faisceau nerveux, les fibres de la périphérie (voir fig. 44) seraient exposées à la solution circulante et seraient donc dans une situation analogue à celle de la fibre myélinisée isolée; elles n'abaisseraient donc pas $[K]_o$ et ne participeraient pas à la génération de l'HPT. Ces fibres seraient par contre atteintes les premières par le TEA et contribueraient largement au potentiel d'action composé. Ainsi, la durée du potentiel d'action augmenterait dès l'application du TEA sans que l'HPT varie.

Après un temps suffisant (environ 15 minutes d'après la figure 43) les fibres du centre du faisceau, qui seraient responsables de l'HPT car leur espace extra-cellulaire est réduit et longtemps protégé de la diffusion, seraient atteintes par le TEA. La P_K de ces axones diminuant l'HPT disparaîtrait plus tardivement.

Cette interprétation a certaines implications.

1°/ - Une fraction des fibres myélinisées seulement participerait à la génération de l'HPT alors que toutes contribuent au potentiel d'action global.



- Figure 44 -

Représentation schématique d'une section du faisceau de fibres dans le milieu de survie. Le milieu diffuse facilement dans les espaces inter-cellulaires des axones périphériques. On peut donc admettre que la P_K des fibres périphériques est bloquée dès l'application de TEA; ces fibres cependant ne participent pas à la génération de l'HPT car elles sont en permanence lavées par le milieu extérieur qui maintient une $[K]_e$ normale. Par contre, après quelques minutes, le TEA atteignant le centre du faisceau inhibe la P_K des fibres centrales. Celles-ci contribuent à la génération de l'HPT car elles peuvent facilement abaisser $[K]_e$. C'est donc seulement lorsque ces fibres centrales sont atteintes par le TEA que l'amplitude de l'HPT décroît (voir figure 43).

Ceci expliquerait que le rapport entre l'amplitude de l'HPT, et l'amplitude du potentiel d'action, évalué à 4,2% en moyenne (voir section II.1), puisse varier notablement d'une préparation à une autre, selon l'importance de l'espace extra-cellulaire par exemple.

On peut dès lors prévoir que le rapport amplitude HPT/ amplitude du PA soit différent pour un faisceau important et compact d'une part et pour un petit faisceau ou un faisceau dilacéré d'autre part.

En outre, le rapport amplitude HPT/amplitude PA est certainement beaucoup plus élevé pour les fibres qui créent l'hyperpolarisation que ne le laisse supposer l'enregistrement.

Ainsi, les fibres de la périphérie qui ne participent pas à l'HPT constituent un shunt (Re diminue) pour les fibres du centre au moment où se développe l'HPT, de sorte que le facteur de court-circuit Re/Re + Ri est plus grand pour le potentiel d'action global et le potentiel de repos que pour l'HPT.

Il découle de ces considérations que la variation de $[K]_e$ créée par l'activation de la pompe dans le faisceau, est certainement sous-estimée si l'on cherche à l'évaluer d'après l'amplitude de l'HPT mesurée.

On observera enfin, que l'existence d'une relation linéaire entre l'amplitude de l'HPT et celle du potentiel d'action global, (mise en évidence dans les figures 15, 16 et 17, section II.1 et II.2) signifie que la proportion de fibres participant à l'HPT par rapport à celles qui n'y participent pas, reste à peu près constante. Ceci peut se concevoir si le recrutement des fibres en activité dépend de l'intensité de stimulation (fig. 15 et 16), à condition que la densité des lignes de courant traversant le faisceau soit uniforme. On le comprend moins bien dans le cas de la figure 17 où le nombre de fibres actives dépend de la vitesse de pénétration de la tétrodotoxine dans le faisceau. Dans ce cas, l'amplitude du potentiel d'action devrait rapidement diminuer sans variation concomitante de l'amplitude de l'HPT.

Nous n'avons jamais pu observer cette "désynchronisation" mais il convient de rappeler que la pénétration de la TTX est très rapide. Il s'en suit que le nombre de mesures, au début de l'application du poison, est toujours très petit. L'incertitude est donc grande en ce qui concerne le profil de la courbe présentée dans la figure 17, pour les amplitudes élevées du potentiel d'action.

Nous ne pensons cependant pas que cette difficulté puisse mettre réellement en cause l'interprétation proposée pour expliquer la désynchronisation entre la durée du potentiel d'action et l'amplitude de l'HPT pendant l'action du TEA.

Quoi qu'il en soit, il est clair que ce résultat (fig. 43) ne peut en aucune façon rendre compte d'une HPT qui procederait d'un accroissement de P_K.

A ce point de l'exposé de nos résultats, nous retenons que l'action du TEA peut être, à la rigueur, expliquée par une action inhibitrice directe de cet agent sur le système transporteur Na-K mais beaucoup plus probablement par une inhibition banale de P_K, l'HPT résultant, dans cette hypothèse, de la variation de $[K]_e$ créée par l'activation post-tétanique de la pompe.

Si tel est effectivement le cas, l'HPT doit dépendre de la valeur initiale (avant le tétanos) de E_K. Ainsi, elle doit être en principe moins ample dans un milieu enrichi en potassium que dans le Ringer ordinaire car, dans ce cas, pour une même activité de la pompe, la variation relative de $[K]_e$ (et donc de E_K) sera d'autant plus petite que la concentration initiale en potassium est élevée.

Nous avons donc tenté de vérifier cette hypothèse par la série d'expériences suivantes.

V.6 - L'amplitude de l'HPT diminue dans le Ringer enrichi en potassium.

Les expériences ont consisté à comparer l'amplitude de l'HPT obtenue dans la solution de Ringer ordinaire (contenant

2,5 mM de KCl) à celle qui résultait d'un même tétanos (15 secondes, 150 Hz) imposé dans un Ringer enrichi en potassium (10 mM et quelquefois 20 mM).

La figure 45 représente les enregistrements correspondant à l'une de ces expériences. Des impulsions de courant constant destinées à suivre l'évolution simultanée de la résistance de membrane, ont été appliquées périodiquement à différents instants.

On voit clairement (fig. 45, a et b) que l'amplitude de l'HPT diminue dans le milieu 4 fois plus riche en potassium que le milieu normal.

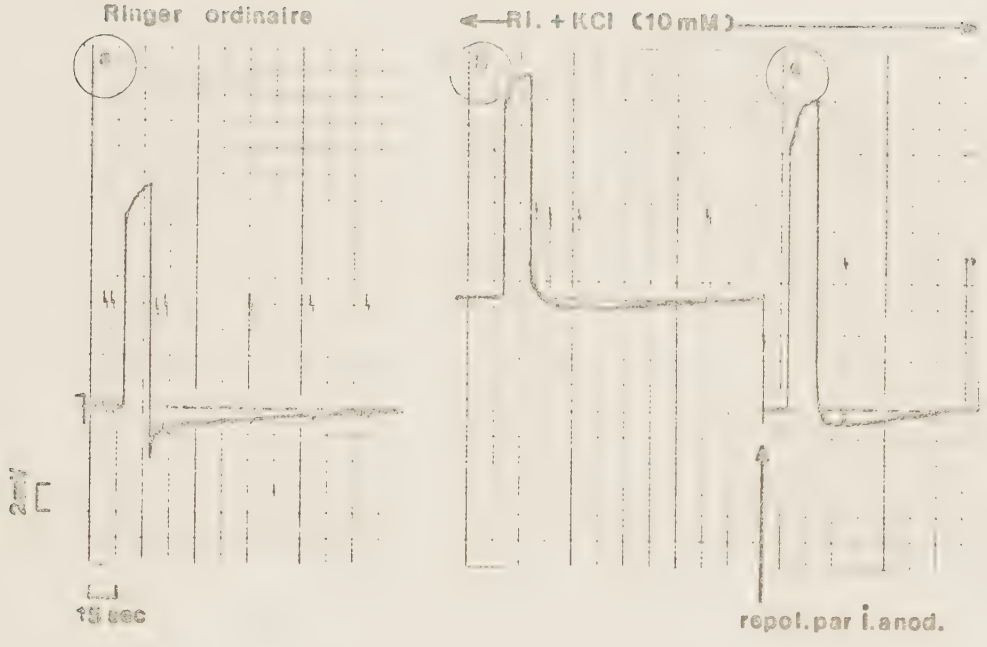
Il importe cependant de noter que cette diminution pourrait résulter d'une entrée insuffisante de sodium dans les axones au cours du tétanos car la membrane est dépolarisée de 12 à 15 mV si l'on tient compte du facteur de court-circuit.

Une telle dépolarisation, pour des fibres myélinisées, est très largement suffisante pour tripler le taux d'inactivation de la perméabilité au sodium par rapport à sa valeur normale (voir FRANKENHAEUSER, 1959). Nous avons d'ailleurs couramment observé dans les milieux riches en potassium une nette diminution de l'amplitude des potentiels d'action pendant le tétanos.

D'autre part, comme on peut facilement le constater dans la figure 45 a et b, la résistance de membrane chute en raison de la dépolarisation (voir également fig. 40) et de la présence de potassium (SCHMIDT, 1962 et 1964). Cette diminution de résistance, si l'HPT représente le caractère électrogénique du transporteur Na-K, peut réduire la d.d.p. créée par l'activation de la pompe Na-K.

Nous avons donc repolarisé la membrane au niveau du potentiel de repos normal par un courant anodique constant (fig. 45 c).

Dans ces conditions, le taux d'inactivation de P_{Na} étant plus faible que dans la situation normale, les potentiels



- Figure 45 -

Effet de la variation de la concentration extra-cellulaire en potassium sur l'amplitude de l'HPT.
Variation du potentiel de membrane et de l'HPT produite par une stimulation tétanique (150 Hz, 15 sec) .
a/ - dans le Ringer normal.
b/ - dans une solution de Ringer enrichie en potassium (10 mM).
c/ - dans la même solution qu'en b mais après repolarisation par un courant anodique constant. Noter que l'amplitude de l'HPT réduite en b n'est pas restaurée par la repolarisation.
Avant et après la stimulation tétanique des impulsions de courant constant ont été appliquées à la préparation afin de mesurer sa résistance. Noter que cette résistance est plus grande en c qu'en a pour un même niveau du potentiel de membrane.

d'action avaient une amplitude légèrement supérieure à la normale (ce que l'on peut d'ailleurs déduire de l'accroissement de la dépolarisation tétanique de la fig. 45). En outre, il est très intéressant de constater que la résistance membranaire est augmentée par rapport à sa valeur normale (fig. 45 a et c). Ce résultat étonnant est en excellent accord avec les données de SCHMIDT (1964) qui montre, en présence de KCl 10 mM, et pour cette concentration seulement, un accroissement de Rm.

Malgré cela, il apparaît que l'amplitude de l'HPT, particulièrement à la fin du tétanos, est inférieure à sa valeur dans les conditions normales. On notera également que la phase initiale de l'HPT est abolie.

Ces expériences permettent donc de conclure :

a/ - que l'HPT ne représente pas le caractère électrogénique de la pompe,

b/ - que l'amplitude de l'HPT, et sa phase initiale en particulier, dépendent étroitement de la concentration extracellulaire en potassium.

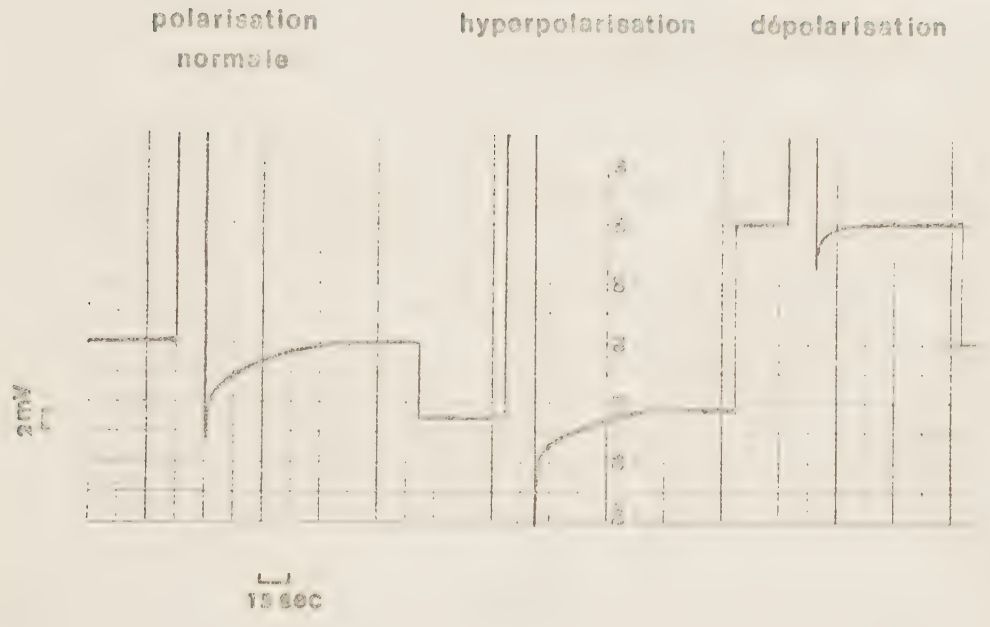
c/ - que l'HPT, globalement, tend à suivre les variations de E_K.

Il est donc intéressant, compte-tenu de ces résultats, de compléter ces expériences par l'analyse des variations de l'HPT à différents niveaux du potentiel de membrane, dans les conditions normales, c'est à dire, dans le Ringer ordinaire.

V.7 - L'amplitude de l'HPT dépend du potentiel de membrane.

Le transport actif de sodium et potassium est en principe insensible aux variations de polarisation membranaire (cette donnée "classique" vient d'être remise en question par KOSTYUK, KRISTHAL et PIDOPLICHKO, 1972 et sera discutée plus loin).

Par contre, les transports passifs y sont sensibles



- Figure 46 -

Effets des variations du potentiel de membrane imposés par des courants constants sur l'amplitude de l'HPT.
Noter que l'amplitude de l'HPT est légèrement augmentée par l'hyperpolarisation de la membrane ; en revanche, elle est diminuée si la préparation est dépolarisée.

puisqu'ils dépendent de la perméabilité membranaire (variable avec le potentiel) et des gradients électrochimiques.

On peut donc attendre :

a/ - si l'HPT résulte d'une variation de E_K créée par la pompe, qu'une hyperpolarisation réduise l'amplitude de l'HPT et qu'une dépolarisation l'augmente.

b/ - si l'HPT représente le caractère électrogénique de la pompe, elle doit être insensible aux variations du potentiel.

Nous avons donc polarisé la membrane à différents niveaux par un courant constant et imposé des tétanos identiques (15 secondes, 150 Hz).

La figure 46 montre :

a/ - que l'amplitude de l'HPT dépend du potentiel de membrane.

b/ - qu'elle tend à diminuer avec la dépolarisation et légèrement augmenter avec l'hyperpolarisation.

Un tel résultat, a priori, n'est en accord avec aucune des hypothèses proposées. Il peut s'accorder, en première analyse, avec un système transporteur électrogénique si l'on observe que la dépolarisation diminue la résistance de membrane alors que l'hyperpolarisation tend à l'augmenter légèrement (fig. 40) mais il faut remarquer qu'une telle interprétation n'est pas en accord avec les données précédemment obtenues.

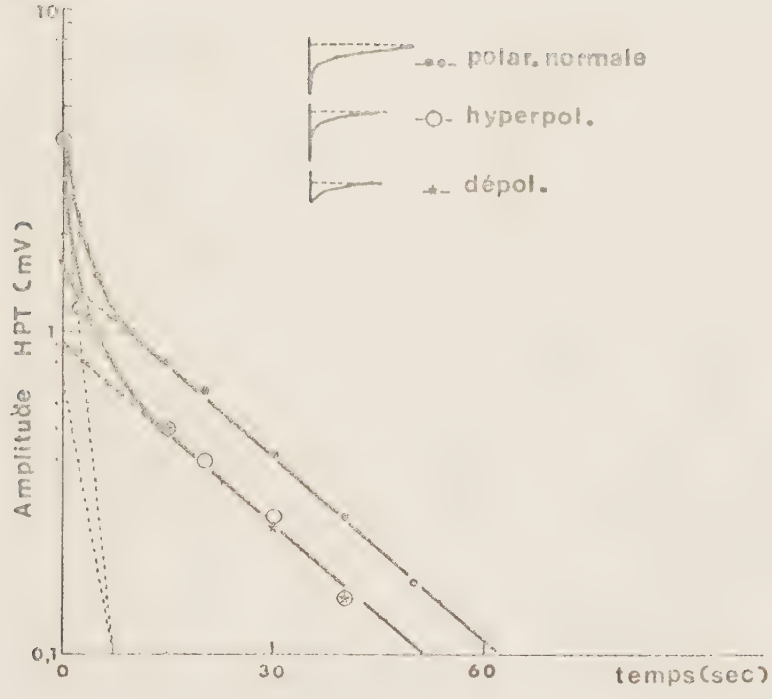
Nous avons donc analysé les constantes de temps de l'HPT pour différents niveaux de polarisation membranaire.

La figure 47 montre :

a/ - que la constante de temps de l'HPT_2 (phase lente) est rigoureusement inchangée par la polarisation (23 secondes pour les trois niveaux de polarisation);

b/ - que celle de l'HPT_1 est inchangée par l'hyperpolarisation (2,5 secondes)

c/ - que la constante de temps de l'HPT_1 est légèrement augmentée par la dépolarisation (3 secondes).



- Figure 47 -

Effets des variations du potentiel de membrane sur les constantes de temps de l'HPT.
Représentation en coordonnées semi-logarithmiques des variations du potentiel de membrane pendant l'HPT en fonction du temps, dans les conditions normales, et lorsqu'une hyperpolarisation de 10 mV et une dépolarisation de 13 mV sont imposées à la préparation préalablement à la stimulation.
Noter que T_2 (constante de temps de la phase retardée de l'HPT) ne varie pas alors que T_1 est légèrement augmentée par la dépolarisation.

augmentée par la dépolarisation (3 secondes).

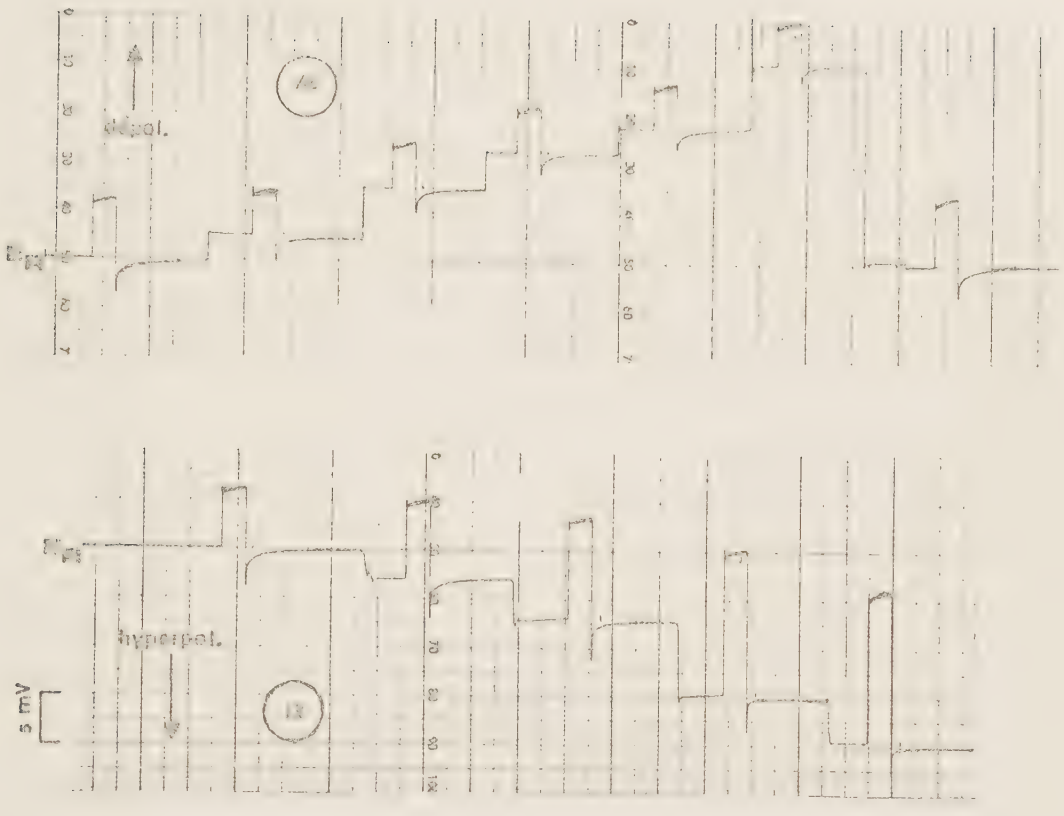
Ces résultats montrent donc que la vitesse de transport ne dépend pas du potentiel de membrane pendant la phase lente.

Il apparaît ici encore une certaine indépendance entre la phase rapide et la phase lente. C'est pourquoi, nous avons analysé les amplitudes de chacune de ces phases, juste à la fin du tétanos, en fonction du potentiel de membrane.

Pour cela, à partir de résultats expérimentaux similaires à ceux qui sont représentés dans la figure 48, nous avons tracé sur des graphiques (fig. 49) la variation d'amplitude maximum (fin du tétanos) de l'HPT globale en fonction des polarisations préalablement imposées à la préparation par un courant constant. Afin de savoir comment varient dans ces conditions la phase lente et la phase initiale rapide, chaque enregistrement a été agrandi et reproduit en coordonnées semi-logarithmiques comme nous l'avons fait pour la détermination des constantes de temps.

La valeur de l'amplitude de l'HPT_2, juste à la fin du tétanos, a été obtenue par extrapolation, au temps zéro, des droites log HPT_2 en fonction du temps. Cette amplitude a été portée sur le graphique pour les différentes valeurs de potentiel de membrane imposées à la préparation.

En fin par différence entre l'amplitude maximum et l'amplitude de l'HPT_2 au temps zéro, nous avons obtenu une amplitude que nous considérons représenter HPT_1.



- Figure 48 -

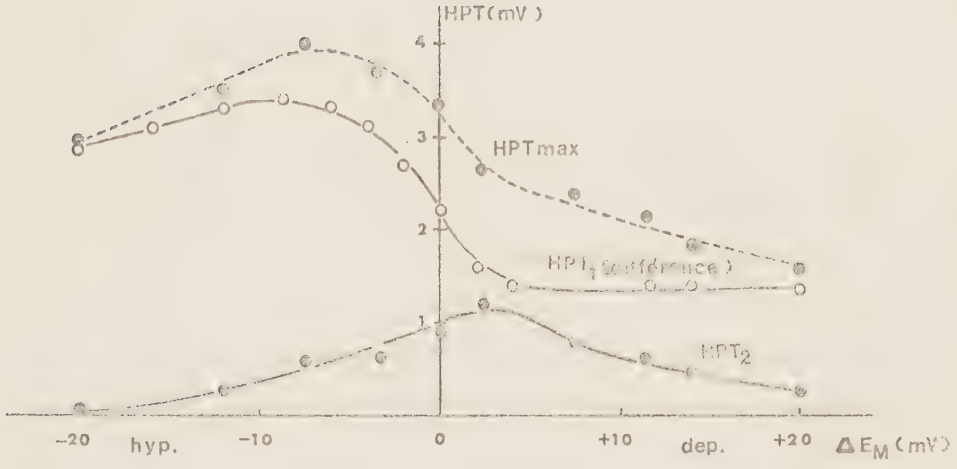
Enregistrements de l'HPT à différents niveaux du potentiel de membrane.
En haut , pour cinq dépolarisations continues différentes.
En bas , pour quatre hyperpolarisations.
Le premier enregistrement de chaque série correspond à la polarisation normale. La durée des tétanos était de 15 secondes, la fréquence était de 150 Hz.

On voit ainsi dans la figure 49 que l'HPT_1 et l'HPT_2 varient indépendamment l'une de l'autre, l'optimum de l'accroissement initial (HPT_1) apparaît pour un potentiel de membrane nettement plus élevé que celui de la phase lente.

On notera d'autre part que la phase lente (HPT_2) peut être annulée par l'hyperpolarisation, ce tend à prouver que le phénomène suit les variations de E_K alors que l'HPT_1 ne décroît que faiblement avec l'hyperpolarisation.

L'interprétation de ces résultats est complexe. On observera d'abord que si l'HPT_2 est, comme nous le pensons, le reflet de l'activité de la pompe, via les changements de E_K, ce phénomène doit diminuer lorsque la polarisation imposée tend vers des valeurs supposées élevées de E_K (donc en direction des hyperpolarisations) : l'HPT_2 devrait cependant augmenter aussi avec la dépolarisation et nous ne l'observerons pas, au contraire. On peut donc voir dans cette dernière observation une donnée expérimentale incompatible avec l'interprétation que nous donnons de l'HPT. Nous pensons que la diminution d'amplitude de l'HPT_2 avec la dépolarisation n'est pas, en réalité, en contradiction avec l'interprétation que nous en donnons; il importe en effet de considérer que la dépolarisation continue inactive la perméabilité au sodium des fibres myélinisées. L'HPT a donc toutes raisons de diminuer avec les dépolarisations de la membrane et le fait que la diminution ne soit pas brutale est finalement en assez bon accord avec les prévisions puisque deux facteurs tendent à agir en sens inverse sur l'HPT : la réduction de l'entrée de sodium par inactivation de P_{Na} et l'accroissement de la d.d.p. $E - E_K$.

D'un point de vue qualitatif, il semble donc que les variations de l'HPT sont en bon accord avec les variations attendues de E_K si la pompe, activée par l'entrée de sodium pendant le tétanos, absorbe le potassium et réduit la concentration de ce cation dans l'espace extra-cellulaire. Si cette interprétation est correcte, on peut attendre qu'après une tétanos le potentiel d'équilibre des ions potassium soit continuement varia-



- Figure 49 -

Variation de l'amplitude de l'HPT en fonction des variations du potentiel de membrane (ΔEm) imposés à une préparation dans une expérience analogue à celle qui a été présentée dans la figure précédente.
- La courbe en trait interrompu et points noirs représente l'amplitude maximum globale de l'HPT.
- La courbe HPT_2 (trait continu, points noirs) représente la variation d'amplitude extrapolée au temps zéro (fin du tétanos) de la phase lente de l'HPT.
- La courbe HPT_1 (trait continu, cercles) est obtenue par différence entre les deux courbes précédentes. Elle représente donc la variation d'amplitude de la phase initiale en fonction des variations du potentiel de membrane.
- En abscisses, la valeur 0 correspond au potentiel de repos normal.
Noter le décours différent des courbes HPT_1 et HPT_2.

ble pendant toute la durée de l'HPT. Si E_K, juste à la fin du tétanos, est plus élevé que pendant la phase lente, une hyperpolarisation continue de la membrane peut annuler l'HPT à un instant donné pendant la phase lente (HPT_2) et ne pas annuler la phase initiale pour autant. Si cette explication était suffisante toutefois, les courbes représentent les variations de HPT_1 et HPT_2 en fonction du potentiel de membrane (fig. 49) devraient avoir un décours approximativement semblable. Il n'en est rien et l'on est obligé d'envisager d'autres hypothèses ou des explications complémentaires.

On observera, dans la figure 49, que le décours sigmoïde de la variation d'HPT_1 en fonction du potentiel de membrane ressemble beaucoup à la variation de la résistance membranaire telle qu'elle a été analysée par SCHMIDT (voir fig.40). Si cette ressemblance n'est pas fortuite, on peut admettre que l'accroissement de résistance de la membrane passive "amplifie" les signes d'activité de la pompe Na-K ce qui peut signifier que la phase initiale de l'HPT traduit le caractère électrogénique du système transporteur. On comprendrait dans ce cas que la phase initiale de l'HPT ne s'annule pas avec l'hyperpolarisation membranaire.

Une autre possibilité serait que l'activité de la pompe électrogénique est augmentée par l'hyperpolarisation; cette interprétation a été proposée par NAKAJIMA et TAKAHASHI (1966) pour les récepteurs à l'étirement des Crustacés. Mais elle est en contradiction avec les résultats récents de KOSTYUK, KRISHTAL et PIDOPLICHKO (1972) déjà mentionnés et ceux de HOROWICZ et GERBER (1965) obtenus sur la fibre musculaire de Grenouille. Pour KOSTYUK et col. la pompe Na-K perdrait son caractère électrogénique du fait d'un accroissement de l'influx potassium avec l'hyperpolarisation (le rapport de couplage Na/K tendrait vers 1 car l'efflux de sodium serait inchangé alors que l'influx de potassium par unité de temps serait accru).

Nos résultats tendent à démontrer l'inverse. En outre si la phase initiale de l'HPT représente le caractère électrogé-

nique du transporteur on ne voit pas pourquoi :

a/ - cette phase serait abolie par le TEA alors qu'elle devrait être accrûe puisque la résistance de membrane augmente dans ce milieu.

b/ - cette phase serait abolie (fig. 45 b) dans le milieu riche en potassium alors que la repolarisation de la membrane, dans ce milieu (fig. 45 c), accroît la résistance de membrane.

c/ - un tel phénomène ne serait pas décelable sur la fibre myélinisée isolée.

Il apparaît donc raisonnable d'abandonner définitivement cette hypothèse et de rechercher une interprétation différente.

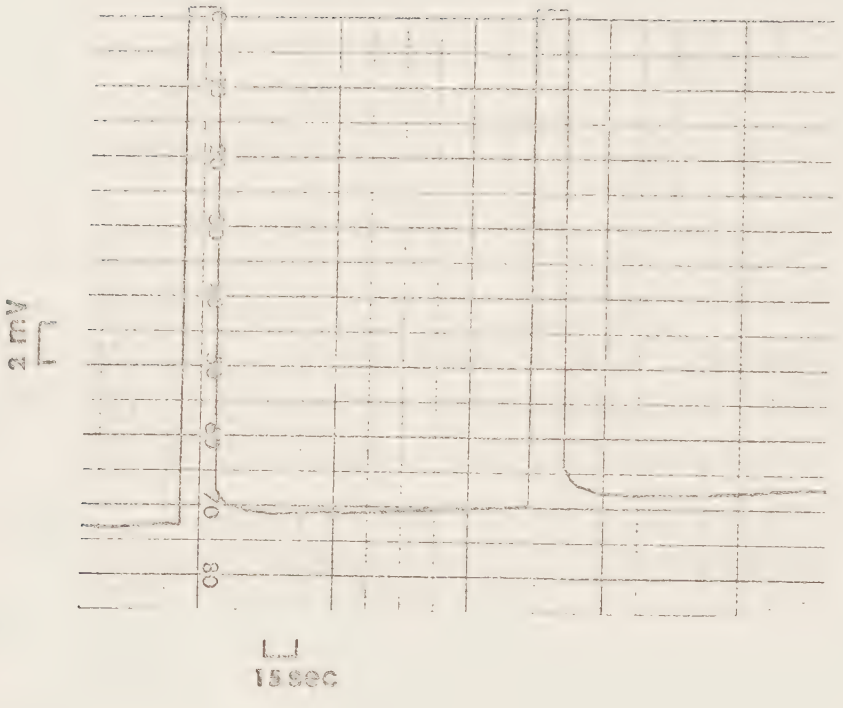
Reconsidérant la courbe sigmoïde représentant la variation de l'HPT_1 dans la figure 49, on peut noter que celle-ci ressemble aussi à une courbe d'inactivation de la perméabilité au sodium (courbe "h_∞" en fonction du potentiel de membrane).

Deux possibilités peuvent être envisagées dans ces conditions; la polarisation agirait par :

a/ - un effet direct qui résulterait d'une variation (diminution avec la dépolarisation) de la concentration en sodium accumulé au voisinage de la face interne de la membrane nodale.

b/ - un effet indirect qui résulterait de la variation d'amplitude du potentiel d'action (diminution avec la dépolarisation) et donc, de la sortie de potassium dans l'espace extracellulaire ou de l'accroissement de P_K.

L'hypothèse a/peut être éliminée car le décours de l'HPT présenté dans la figure 45 c devrait être identique à celui de la figure 45 a puisque le taux d'inactivation de P_{Na} est en principe le même dans les deux cas. L'hypothèse b/- paraît donc plus vraisemblable; c'est pourquoi nous avons entrepris l'expérience suivante.



- Figure 50 -

Variations du potentiel de membrane produites par des impulsions dépolarisantes durables en présence de TTX (1.10^{-6} g/ml). Observer , à la fin de l'impulsion, une post-dépolarisation, interprétée comme une accumulation de potassium dans l'espace périnodal.

V.8 - Une dépolarisation prolongée appliquée pendant la phase lente restaure la phase rapide.

Cette expérience a été conçue en partant des principes suivants :

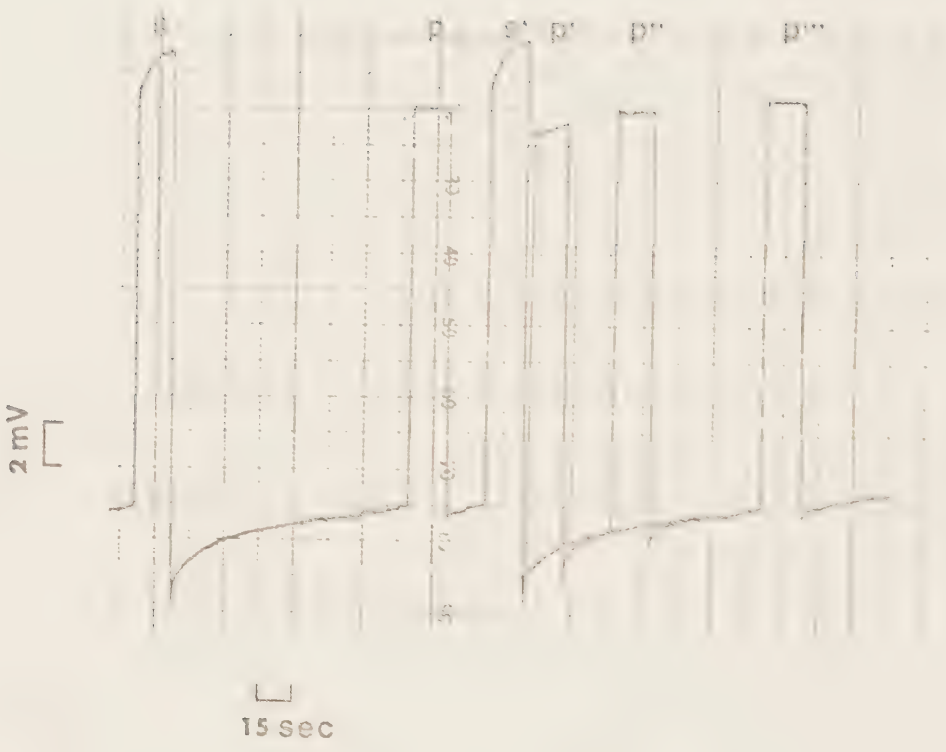
On sait (FRANKENHAEUSER, 1962) que la perméabilité au potassium de la fibre myélinisée s'accroît avec la dépolarisation. Si l'amplitude de cette dépolarisation est convenablement choisie, l'inactivation de la perméabilité au potassium reste négligeable même si la dépolarisation est durable (voir SCHWARTZ et VOGEL, 1971). Par ailleurs, plus importante est la dépolarisation, pour une perméabilité donnée, plus grande est la d.d.p. $E - E_K$ et donc, plus importante est la sortie passive de potassium.

Nous avons d'abord vérifié, par une expérience simple, qu'une dépolarisation durable, même de faible amplitude, augmente effectivement et momentanément la concentration extracellulaire en potassium.

La préparation étant baignée par une solution de Ringer contenant de la tétrodotoxine (TTX à la concentration de 1.10^{-6} g/ml), une impulsion de courant constant est appliquée pendant 15 secondes et produit une dépolarisation de l'ordre d'une quinzaine de mV.

La figure 50 montre qu'à la fin d'une telle impulsion, la repolarisation de la membrane est momentanément retardée (post-dépolarisation). La perméabilité au sodium étant bloquée par la TTX et la perméabilité au potassium étant normale, la post-dépolarisation ne peut être expliquée que par une accumulation momentanée de potassium dans l'espace extra-cellulaire des fibres profondément situées dans le faisceau.

On voit donc qu'une dépolarisation durable peut être un moyen de simuler la variation de P_K et l'accroissement de $[K]_e$ survenant pendant un tétanos. L'entrée de sodium, dans les conditions normales, peut être considérée comme très faible ou



- Figure 51 -

Effets d'impulsions dépolarisantes durables sur le potentiel de membrane avant et après stimulation tétanique.
La préparation est soumise à deux salves tétaniques (s et s') et à des impulsions de courant constant et dépolarisant de 15 secondes p, p', p'', p''', avant et après la deuxième stimulation tétanique.
Noter qu'avant la salve s', la dépolarisation p est suivie d'une hyperpolarisation discrète; après la salve tétanique, les hyperpolarisations qui suivent p', p'' et p''' sont nettement plus marquées qu'après p. Le décours de l'HPT correspondant à s' a été figuré en trait interrompu en reportant celui de l'HPT correspondant à la première salve s.

nulle car beaucoup de fibres myélinisées "accommodent" du fait de l'inactivation de P_{Na} et de l'accroissement de P_K (voir VALLBO , 1964 et BERGMAN, 1969); très peu de potentiels d'action sont donc évoqués par l'impulsion.

Nous avons donc comparé les effets d'une impulsion de courant constant dépolarisant et durable (15 secondes) d'amplitude insuffisante pour exciter les axones (10 mV environ) dans les deux conditions suivantes :

1° - avant un tétanos,

2° - à différents instants pendant l'HPT.

La figure 51 montre les résultats d'une telle expérience. On peut voir successivement, de la gauche vers la droite: l'HPT correspondant à un tétanos de 15 secondes à 150 Hz (s), puis, après quasi-stabilisation du potentiel de membrane, la variation de potentiel créée par l'impulsion de courant constant (p). On note qu'à la fin de cette impulsion, une très légère surpolarisation s'installe pendant quelques secondes.

Ensuite , une deuxième salve (s'), identique à la première, est de nouveau appliquée puis des impulsions, p', p", et p"' se succèdent à différents instants.

On voit facilement que les impulsions restaurent une phase rapide d'autant plus ample qu'elles surviennent tôt après la fin du tétanos. Cette expérience, que nous pensons importante démontre :

1° - que la concentration intra-cellulaire en sodium doit avoir été augmentée par une stimulation tétanique préalable pour que l'impulsion dépolarisante soit efficace (ce qui explique aussi qu'elle le soit moins si elle survient tardivement pendant l'HPT).

2° - que sur des fibres dont la concentration intra-cellulaire en sodium est accrûe, la phase initiale de l'HPT dépend soit de la variation de P_K soit celle de $[K]_e$ (et peut être aussi de ces deux facteurs à la fois).

3° - que l'HPT survient sur la membrane des fibres myéliniques et ne résulte pas d'une activation des axones amyéliniques par l'accroissement de $[K]_e$ consécutif à l'activation des fibres myélinisées. En effet, si les fibres amyéliniques étaient stimulées par l'accroissement de $[K]_e$, leur pompe serait activée par l'impulsion dépolarisante seule et l'effet de celle-ci ne serait pas modifié par l'excitation préalable des axones myélinisés.

Dans ces conditions, nous devons discuter maintenant les modalités d'action de l'impulsion dépolarisante puisqu'elle peut agir de deux façons différentes.

Variation de P_K.

Compte-tenu de ce qui a été dit, on peut admettre qu'après une dépolarisation soutenue d'une dizaine de mV, P_K est plus élevée qu'au niveau du potentiel de repos. Dans ce cas, on peut penser que la membrane axonale, à la fin d'un tétanos, se comporte comme une électrode au potassium plus sélective qu'au potentiel de repos et ceci, en particulier aussi, en raison d'une inactivation de P_{Na}. Par conséquent, un accroissement du rapport P_K/P_{Na} peut facilement se superposer à une augmentation de $[K]_e$ à la fin du tétanos et rendre compte,,en partie au moins, de la phase initiale de l'HPT. La phase lente (HPT_2), résultant également de l'abaissement de $[K]_e$,serait décelée par une membrane passive moins sélective pour le potassium. Il importe néanmoins d'observer que le potentiel d'équilibre des ions potassium ne peut pas être le même juste à la fin du tétanos que pendant la phase lente puisque l'HPT_2 peut être annulée par une hyperpolarisation d'une vingtaine de mV insuffisante pour abolir la phase initiale (voir fig. 48 et 49).

Variation de $[K]_e$.

L'hyperpolarisation de HPT_2 produite par le tétanos lui-même

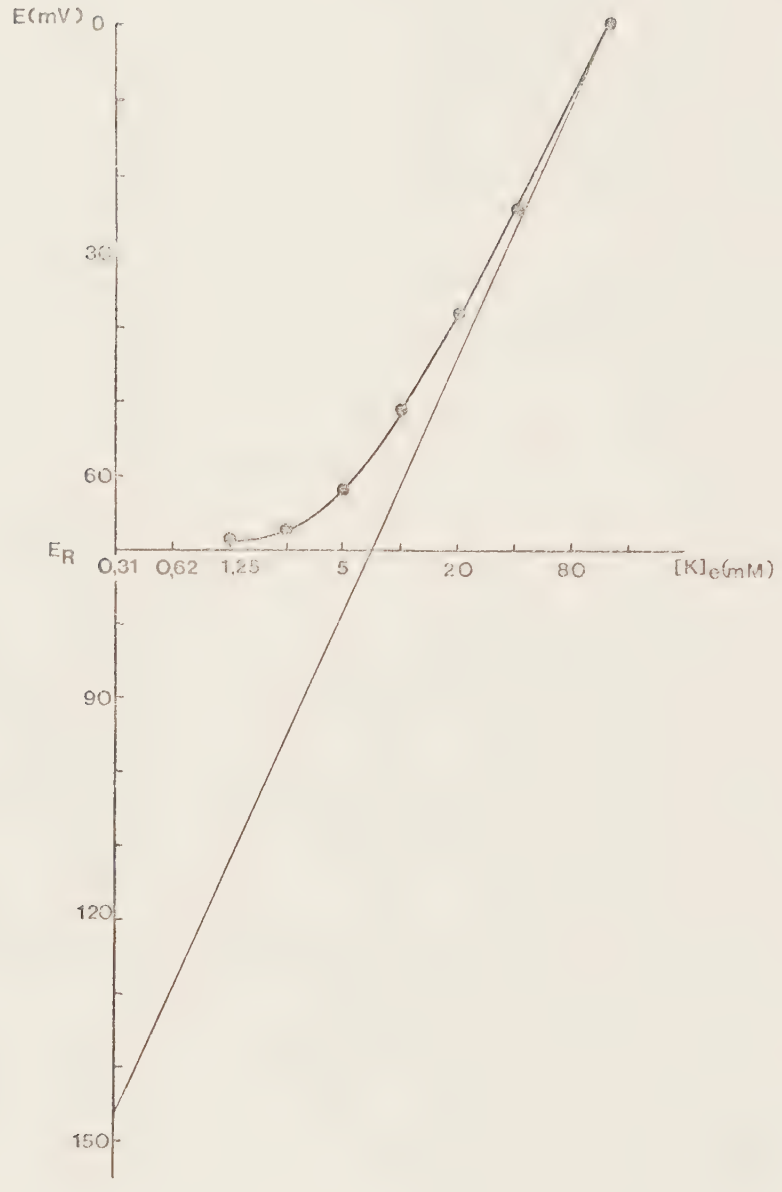
ne peut aller que dans le sens d'une augmentation. Celle qui résulte de l'activation de la pompe Na-K est une diminution. Il faut donc admettre que la pompe, à la fin du tétanos, est capable d'absorber très rapidement l'excédent d'ions K^+ dans le voisinage immédiat de la membrane, c'est à dire dans l'espace perinodal. Dans le cas où le faisceau nerveux est baigné par une solution riche en potassium (fig. 45) le tétanos accroît encore $[K]_e$ et la pompe, bien qu'aussi active que dans le milieu normal si $[Na]_i$ est aussi élevé, ne peut créer une variation relative de $[K]_e$ (et donc de E_K a fortiori) aussi importante que dans le Ringer ordinaire. Il importe toutefois d'oberver que l'on ne peut imaginer, que la fin du tétanos soit la cause d'une suractivation réelle de la pompe. Cet instant correspond en effet à l'arrêt de l'entrée passive de sodium dans le compartiment intra-cellulaire et surtout, à la cessation brusque de l'approvisionnement en potassium de l'espace perinodal. Si $[Na]_i$ est très élevée à cet instant on peut concevoir qu'une pompe très active épuise rapidement le potassium disponible dans le voisinage immédiat de la membrane ce qui, en retour, bloquerait ou ralentirait fortement son activité. La décroissance relativement rapide de la phase initiale pourrait résulter de cette auto-inhibition.

Cette hypothèse aurait l'avantage d'expliquer qu'à partir d'une certaine quantité de sodium entré dans les axones au cours du tétanos, l'HPT n'augmente plus (fig. 12) tout se passant comme si le système transporteur avait atteint sa capacité de transport maximum (TM). Ce TM dépendrait, on le conçoit facilement, de plusieurs facteurs :

1 - de la concentration initiale en potassium dans le milieu;

2 - de la quantité de potassium libérée par la stimulation tétanique et donc, de tout facteur susceptible de la faire varier (fréquence d'excitation, amplitude des potentiels d'action voir figures 14 et 19.

3 - de la diffusion, à l'intérieur du faisceau et vers le milieu circulant, du potassium libéré pendant le tétanos.



- Figure 52 -

Variation du potentiel de membrane (E) en fonction de la concentration extra-cellulaire en potassium($[K]_e$)pour une fibre myélinisée isolée (points noirs).(D'après HUXLEY et STAMPFLI 1951).
La droite continue a été calculée sur la base de l'équation de NERNST pour $[K]_i$ = 117 mM à la température de 20°C.

Ainsi, le facteur limitant l'activité de la pompe (et donc l'amplitude de l'HPT) résulterait d'un équilibre entre l'absorption de potassium et la diffusion de ce cation depuis l'espace extra-cellulaire jusqu'à l'espace périnodal. On comprend alors que la phase initiale, traduisant une chute prononcée de la concentration en potassium dans l'espace périnodal, puisse être artificiellement restaurée par une impulsion dépolarisante durable amenant momentanément, et précisément à cet endroit, un appoint de potassium. Cet apport d'ions K^+ serait d'autant plus efficace qu'il surviendrait tôt après la fin du tétanos, c'est à dire à un moment où $[Na]_i$ est élevée et où les besoins sont importants.

Cette hypothèse est séduisante mais il importe d'observer qu'elle ne peut être soutenue ou préférée à la précédente (P_K temporairement plus élevée à la fin du tétanos) que si l'on est en mesure de prouver qu'à la fin du tétanos la concentration extra-cellulaire en potassium chute à une valeur suffisante pour inhiber l'activité de la pompe.

Si l'on se réfère à THOMAS (1972), la réduction du potassium extra-cellulaire doit être prononcée pour inhiber l'activité de la pompe. Selon cet auteur, une réduction de cette activité est perceptible si $[K]_e$ est inférieur à 1 mM mais elle ne devient réellement évidente que pour des concentrations nettement plus faibles (0,25 mM).

Le calcul montre que la valeur de E_K, à 20°C, pour $[K]_e$ = 0,25 mM et 1 mM est de l'ordre de -150 mV et -120 mV pour la fibre nerveuse myélinisée (voir aussi fig. 52).

Si l'on tient compte d'un facteur de court-circuit de 0,65 dans nos expériences, l'inversion de la phase initiale de l'HPT, pour $[K]_e$ = 0,24 mM devrait correspondre à une hyperpolarisation d'un cinquantaine de mV par rapport au potentiel de repos que nous mesurons. Pour $[K]_e$ = 1 mM, l'inversion devrait se produire pour une hyperpolarisation de 33 mV. On pourrait donc comprendre, puique nous n'avons pas dépassé une vingtaine de mV (fig. 48 et 49), que nous n'ayons pu annuler la phase initiale de l'HPT.

.L'amplitude maximum des HPT enregistrées peut paraître, en première analyse, beaucoup trop faible, même si l'on tient compte du facteur de court-circuit habituel, pour rendre compte d'un abaissement de $[K]_e$ suffisant pour inhiber la pompe Na-K. En réalité, on peut répondre facilement que rien ne démontre que le rapport P_K/P_{Na} , à la fin du tétanos, est tel que la cellule se comporte comme une parfaite électrode au potassium. En d'autres termes, si l'inversion de l'HPT doit être effectivement attendue pour des hyperpolarisations de l'ordre de 30 à 50 mV, l'HPT ne doit pas nécessairement atteindre des amplitudes de cet ordre pour rendre compte de l'abaissement de $[K]_e$.

Ainsi, si le rapport P_K/P_{Na} était le même à la fin du tétanos qu'au niveau du potentiel de repos, une variation de $[K]_e$ de 2,5 mM (concentration normale) à 0,3 mM (concentration suffisamment faible pour inhiber la pompe Na-K) conduirait, sur une fibre myélinisée isolée (voir fig. 52) à une hyperpolarisation réelle de l'ordre de 2 mV. En tenant compte d'un facteur de court-circuit de 0,65 une chute aussi marquée de $[K]_e$ correspondrait dans nos conditions expérimentales à une HPT d'amplitude maximum voisine de 1,4 mV. L'expérience démontre qu'après des tétanos de 15 secondes à 150 Hz, l'amplitude des HPT enregistrées est toujours 3 à 4 fois supérieure à cette valeur. Il ne fait donc aucun doute que le rapport P_K/P_{Na} est plus élevé juste à la fin du tétanos qu'au niveau du potentiel de repos.

> Ceci confirme en fait les expériences de MEVES (1961) et n'est pas en contradiction, il convient de le souligner, avec les résultats de nos mesures de résistance de membrane (fig. 39) qui n'ont pas été faites à l'instant où l'HPT atteint son amplitude maximale.

Par ailleurs,on observera qu'un important abaissement de $[K]_e$ est d'autant plus plausible que l'HPT enregistrée est produite par une fraction seulement des fibres du faisceau (c.f. hypothèse proposée par ASCHER). Ceci revient à dire que l'amplitude réelle de l'HPT, au niveau des axones du centre du faisceau est nettement plus ample en réalité que ne le laissent supposer nos enregistrements.

nos enregistrements.

Nous concluons donc :

1 - que le rapport P_K/P_{Na} est plus élevé juste à la fin du tétanos qu'au niveau du potentiel de repos,

2 - que la concentration extra-cellulaire en potassium, au niveau des fibres qui génèrent l'HPT peut décroître, du fait de l'activité de la pompe, jusqu'à une valeur suffisante pour produire une inhibition de celle-ci.

Compte-tenu des incertitudes portant sur la valeur de $[K]_e$ atteinte, sur celle du facteur de court-circuit réel pendant l'HPT et sur le volume de l'espace extra-cellulaire, il est exclu d'estimer le rapport P_K/P_{Na} et la quantité de potassium transportée par la pompe pendant l'HPT. Néanmoins afin d'estimer l'influence de l'espace extra-cellulaire sur l'amplitude de l'HPT, nous avons entrepris une dernière étude systématique.

VI.1 - Effets de la variation de l'espace extra-cellulaire sur l'HPT.

L'hypothèse selon laquelle l'HPT est créée par une partie seulement des fibres myélinisées du nerf sciatique implique que l'augmentation du volume extra-cellulaire conduise à une réduction de l'amplitude de l'HPT par rapport à celle du potentiel d'action.

Nous avons donc essayé d'analyser les variations du rapport amplitude HPT/ amplitude PA dans des conditions expérimentales différentes :

A/ - sur une très petit faisceau nerveux sans périnèvre comportant une quarantaine de fibres myélinisées de gros diamètre (le rameau moteur innervant le tête du muscle gastrocnémien).

B/ - sur le nerf sciatique intact.

C/ - sur le nerf sciatique sans périnèvre, tel que nous l'avons utilisé dans toutes les expériences décrites jusqu'à

présent.

D/ - sur la même préparation que ci-dessus (C) mais après dilacération du faisceau en fibres de faisceaux secondaires.

Dans chaque cas, le potentiel d'action isolé était photographié sur l'oscilloscope et l'HPT correspondant à un tétanos de 15 secondes à une fréquence de 150 Hz était enregistrée sur le scripteur à plume.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Type d'expériences	Rapport $\frac{\text{ampli. HPT}}{\text{ampli. PA}}$ en %	Nombre d'expériences
A	0	5
B	$2,76 \pm 0,61$	22
C	$4,46 \pm 0,62$	21
D	$6,52 \pm 0,42$	20

Une épreuve de signification montre que la différence entre :

B et C est significative à une probabilité comprise entre 90 et 95%

C et D " " " " " 95 et 99%

B et D " " " supérieure à 99%

Ces résultats montrent d'abord que sur un petit faisceau lâche et bien irrigué par le milieu circulant, l'HPT n'existe pas comme on peut l'observer aussi sur la fibre isolée. Ce résultat est en fait celui que nous attendions.

Les résultats obtenus dans les expériences B, C et D sont en première analyse très décevants et contraires à ceux que nous avions prévus (il importe de noter que toutes ces expériences ont été faites à la même époque en utilisant les deux nerfs sciatiques d'un même animal).

Il apparaisent contradictoires aussi avec ceux que nous avons obtenus dans les expériences de type A.

Comme aucun artefact expérimental, aucun effet saisonnier ou état physiologique différent des animaux ne peuvent être mis en cause, nous considérons ces résultats comme réels et les interprétations en supposant que le rapport amplitude HPT/ amplitude PA croît et passe par une valeur optimum (que nous n'avons pas nécessairement atteinte) si le volume de l'espace extra-cellulaire augmente.

Ceci peut en fait résulter de deux facteurs :

1/ - plus le volume extra-cellulaire est petit et clos (cas limite : le nerf intact); plus la concentration en potassium extra-cellulaire doit être élevée à la fin d'un tétanos. On peut donc comparer cette situation à celle du faisceau baigné par une solution enrichie en potassium (fig. 45) : la variation relative de $[K]_e$ créée par la pompe est plus petite si la concentration initiale en potassium est élevée que si elle est basse. Mais inversement, plus l'espace extra-cellulaire est réduit, plus facilement la pompe Na-K peut abaisser $[K]_e$ au voisinage de la membrane. Il doit donc exister une valeur "optimum" de l'espace extra-cellulaire, pour une fréquence de stimulation et une dur de tétanos données ainsi que pour une concentration initiale en potassium donnée.

2/ - plus les interventions mécaniques sont importantes sur le faisceau (cas limite : faisceau dilacéré) plus nombreuses sont les fibres détruites. Or, il est évident que les fibres détruites sont celles qui sont au bord des faisceaux; ces fibres, dans un faisceau intact, auraient participé au potentiel d'action composé. Comme elles ne produisent plus de potentiel d'action mais contribuent toujours par leur seule présence à limiter l'espace extra-cellulaire, l'amplitude du potentiel d'action est réduite (ce que nous avons effectivement observé) sans que l'amplitude de l'HPT ne soit réellement modifiée. Il s'en suit que le rapport amplitude HPT/ amplitude PA augmente lorsqu'on passe de la série B à la série A.

En conclusion, si ces résultats ne sont pas aussi démonstratifs que nous l'espérions, ils peuvent s'expliquer si l'on admet que l'HPT résulte de la variation de $[K]_e$ créée par l'activation de la pompe Na-K des fibres nerveuses situées au centre du faisceau. Ils seraient inexpliquables si l'hyperpolarisation post-tétanique était attribuée au caractère électrogénique du système transporteur Na-K.

On notera enfin que si l'HPT résultait de l'activation des fibres amyéliniques par le potassium accumulé dans l'espace extra-cellulaire au cours de la stimulation tétanique des axones myélinisés, le rapport amplitude HPT/ amplitude PA serait maximum dans le nerf entier. On sait qu'il n'en est rien et nous avons là un argument supplémentaire plaidant en faveur d'une hyperpolarisation post-tétanique propre aux fibres myélinisées du nerf sciatique.

-:-:-:

C H A P I T R E V

CONCLUSIONS GENERALES.

Les interprétations des résultats expérimentaux ont été discutées dans le chapitre précédent. Nous nous bornerons donc à présenter et à commenter succintement deux tableaux récapitulatifs dans lesquels sont résumées les conclusions essentielles de nos expériences.

Le premier tableau concerne l'interprétation de l'hyperpolarisation post-tétanique en tant que variation de polarisation membranaire. Le second est une récapitulation des résultats expérimentaux qui nous ont permis d'attribuer au contingent myélinisé du nerf sciatique l'origine de l'HPT.

Quatre hypothèses étaient susceptibles d'expliquer l'hyperpolarisation post-tétanique que nous avons étudiée :

a/ - une diminution du potentiel d'équilibre des ions Na^+.

b/ - un accroissement de la perméabilité au potassium;

c/ - le caractère électrogénique d'une pompe Na-K;

d/ - l'augmentation du potentiel d'équilibre des ions K^+ résultant de l'activation d'une pompe Na-K.

Ces quatre possibilités sont analysées dans le premier tableau. Lorsqu'un résultat expérimental est considéré comme favorable ou très favorable à l'une d'elles, il est noté + ou ++; il est noté - ou -- s'il est défavorable ou très défavorable. Si l'expérience n'apporte pas d'argument en faveur ou contre l'une des hypothèses, il est noté 0.

Il convient d'observer que ces conclusions particlles sont celles que nous avons déduites des résultats obtenus dans un contexte expérimental donné; elle peuvent donc différer de celles qui seraient proposées dans une autre situation. Ainsi l'absence d'effet des milieux sans potassium sur l'HPT est noté 0 alors qu'un tel résultat, obtenu sur une cellule isolée, aurait été considéré comme très défavorable à une interprétation de l'HPT formulée dans les termes d'une activation d'un transport actif de sodium et de potassium.

EXPERIENCES EFFECTUEES (références chapitre IV)	Fig.	p.	HYPOTHESES			
			"$\downarrow E_{Na}$"	"$\uparrow P_K$"	" Pompe " électrogène	"Pompe /$[K]_e$
I.1- Amplit.HPT et durée tétanos	12	64	+	+	+	+
I.2- Amplit.HPT et fréqu.tétanos	13	66	+	+	+	+
I.3- Amplit.HPT et nombre constant des PA à différentes fréquences	14	68	++	+	++	++
II.2-Amplit.HPT et TTX	17	78	++	- -	++	++
II.3-Amplit.HPT et $[Na]_e$	19	84	++	+	++	++
III.1- Milieu sans potassium			0	0	0	0
III.2- Abaissement température	20	90	- -	+	++	++
III.3- Ringer lithium	21	92	- -	- -	++	++
III.4- Ringer dinitrophénol	24	96	- -	- -	++	++
III.5- Ringer ouabaïne	26	98	- -	- -	++	++
IV.1- Durée HPT et durée tétanos	27	102	++	- -	++	++
IV.2- Constantes de temps HPT	28	104	+	+	++	++
IV.3- T_1 indépendant durée tétanos T_2 croît avec durée tétanos	29a 29b	106	0 +	++ - -	0 ++	0 ++
IV.4- Décours non exponentiel de HPT à basse température	30	108	- -	- -	+	+
IV.5- Constante de temps et inhibiteurs des transports	31 32 33	110 112	- -	- -	++	++
V.1-Absence effet anions imperméants	36	124	0	0	-	0
V.2- Abolition HPT par le TEA	37	124	-	++	-	++
V.3- Accroissement Rm pendant HPT	39	129	0	- -	0	0
V.4- Pas d'effet de l'accroissement de $[K]_e$ en présence de TEA	41	133	0	++	- -	++
V.5-Désynchronisation HPT et durée du PA pendant application TEA	43	137	0	- -	+	++
V.6- Amplit.HPT dépend de $[K]_e$	44	139	- -	++	- -	++
V.7-Amplit.HPT dépend de Em	46	145	-	- -	+	+
V.8-Dépolarisation pdt HPT	51	156	- -	+	-	+
VI.1-Variation espace extra-cellul.			0	0	-	+

Ce tableau appelle quelques commentaires.

1/ - Il apparaît que certaines expériences (I.1, I.2, I.3 et II.3) sont considérées comme aussi favorables à chacune des hypothèses [illegible] décisives. On doit néanmoins noter qu'il aurait suffi d'un résultat négatif pour compromettre sérieusement l'interprétation que nous donnons de l'HPT.

2/ - Il est normal que les résultats de certaines expériences (V.2, V.5, V.6 et V.8) paraissent aussi favorables à une interprétation de l'HPT formulée dans les termes d'un accroissement du rapport P_K/P_{Na} (hypothèse "P_K") qu'à l'hypothèse "pompe/$[K]_e$". En effet, dans les deux cas, l'interprétation implique que la membrane est perméable aux ions K^+. De même, il n'est pas étonnant que des arguments expérimentaux soient aussi favorables aux hypothèses faisant appel à l'activation de la pompe qu'à une interprétation de l'HPT formulée dans les termes d'une diminution du potentiel d'équilibre des ions sodium (hypothèse "E_{Na}"). En effet,qu'elle soit électrogène ou non, la pompe est activée par l'accroissement de $[Na]_i$, ce qui conduit inévitablement aussi à la diminution de E_{Na}. Mais la possibilité que l'HPT résulte de la variation de ce potentiel d'équilibre peut être exclue par les expériences III.2 à III.5 puisque l'inhibition du transport actif ne pourrait que faciliter l'accroissement de la concentration intra-cellulaire en sodium.

3/ - On notera que l'hypothèse "P_K" peut être pratiquement éliminée dès l'expérience II.2. Elle n'est plus soutenable après les expériences IV.1 bien que les expériences V.2 ou V.4 lui soient très favorables. Ceci implique que l'hypothèse "pompe/$[K]_e$" devient hautement probable à partir de ces dernières expériences.

4/ - L'hypothèse "pompe électrogène " (qui suppose que l'HPT représente le caractère électrogénique de la pompe) est très sérieusement compromise à partir de l'expérience V.2 mais elle ne peut être éliminée que par les expériences V.4 et V.6 qui lui sont très défavorables et ne le sont pas à l'hypothèse "pompe/$[K]_e$". On peut enfin constater que seule cette dernière hypothèse n'est compromise par aucune expérience défavorable.

Un deuxième problème qui devait être résolu était de savoir si le phénomène analysé (HPT) résultait de l'activation de la pompe des fibres myélinisées ou de celle des axones amyéliniques du nerf sciatique. Le tableau suivant est un résumé des différents arguments qui nous ont permis de conclure que l'HPT se développe sur la membrane des fibres myélinisées. L'hypothèse d'une activation, à distance, de la pompe Na-K des fibres amyéliniques par le potassium perdu au cours du tétanos par les fibres myélinisées peut être écartée par les expériences II.2, V.8 et VI.1. D'autres expériences ne peuvent être considérées que comme des présomptions pour que l'HPT résulte effectivement de l'activation des fibres myélinisées. Tel est en effet le cas de l'expérience V.1, favorable à cette hypothèse en ce sens que la perméabilité des fibres myélinisées aux ions chlorure est connue pour être très faible alors que les fibres amyéliniques (de Mammifères tout au moins) sont très sensibles aux variations de la concentration en anion Cl^- dans le milieu externe (RANG et RITCHIE, 1968).

Enfin, on peut faire valoir que si l'HPT du nerf sciatique résultait de l'activation de la pompe Na-K des fibres amyéliniques, l'hyperpolarisation réelle de la membrane de ces axones atteindrait des valeurs invraisemblables. En effet, considérant l'amplitude moyenne de l'HPT enregistrée (4,5 mV) et un facteur de court-circuit estimé à 0,02 (voir page 47) pour les fibres amyéliniques dans le tronc nerveux, un calcul simple montre que l'hyperpolarisation réelle de la membrane axonale serait de l'ordre de 200 mV. Il est évident qu'une telle variation de potentiel est inconcevable et le serait probablement encore si

le facteur de court-circuit était 10 fois supérieur à notre estimation (l'amplitude de l'hyperpolarisation post-tétanique des fibres amyéliniques de Mammifères enregistrée par RITCHIE et coll., dans les conditions normales, est de l'ordre de 2 à 5 mV.

EXPERIENCES EFFECTUEES	Fig.	p.	HYPOTHESES	
			Fibres myélinisées	Fibres amyéliniques
Comptages histologiques			+	+
I.2- Amplit.HPT et fréquence de stimulation	13	66	+	-
II.1-Amplit.HPT et nombre de fibres myélinisées excitées	16	76	++	-
II.2-Amplit.HPT et tétrodotoxine	17	78	++	- -
V.1- Absence effet anions imperméants	36	124	+	-
V.8- Dépolarisation pendant l'HPT	51	156	++	- -
VI.1-Variation espace extracellulaire			+	-
Technique de stimulation			++	- -
Facteur de court-circuit			++	- -

Il apparaît donc raisonnable de conclure que l'HPT du nerf sciatique représente la variation du potentiel des ions potassium résultant de l'activation de la pompe Na-K des fibres myélinisées. L'entrée de sodium au cours du tétanos est la cause primaire de cette activation. Ceci implique, on le notera, que la pompe Na-K des fibres myélinisées se trouve dans la membrane nodale.

Nous avons par ailleurs été amenée à conclure (voir

expérience V.5 et pages 134 à 140) que l'HPT enregistrée sur le nerf sciatique est créée par les fibres myélinisées centrales du faisceau. Ceci signifie que la variation réelle de la concentration en potassium au voisinage de la membrane nodale de ces axones est certainement importante. Il convient d'observer que cette interprétation est la seule qui permette d'expliquer qu'une hyperpolarisation post-tétanique à grande constante de temps apparaisse sur un faisceau compact d'axones myélinisés alors que le même phénomène n'a jamais été observé sur la fibre isolée. Une telle différence de comportement serait d'ailleurs inexplicable si l'HPT enregistrée sur le nerf sciatique représentait le caractère électrogénique du système transporteur Na-K de la fibre myélinisée.

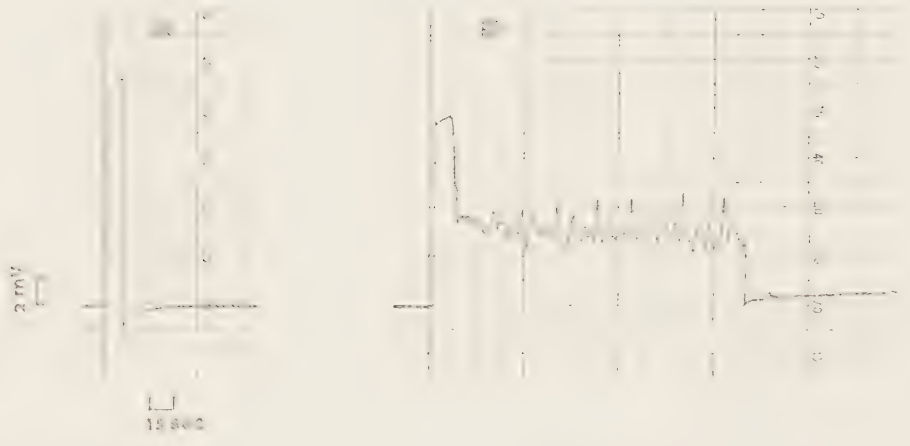
On observera que nos conclusions ne sont pas en accord avec celles de CONNELLY d'une part et de STRAUB d'autre part. Ces auteurs en effet attribuaient l'hyperpolarisation post-tétanique au caractère électrogénique d'une pompe Na-K. L'argumentation la plus sérieuse, avancée par STRAUB, était que dans certaines expériences, l'amplitude maximum de l'HPT dépassait nettement le niveau du potentiel de membrane atteint lorsque le milieu extra-cellulaire est totalement privé de potassium. Cet argument serait acceptable si le rapport P_K/P_{Na}, juste à la fin d'un tétanos était le même qu'au niveau du potentiel de repos. Or, nous avons pu déduire (voir p.162), en accord d'ailleurs avec des données antérieures de MEVES (1961), que ce rapport devrait être plus élevé dans les premiers instants suivant la fin de l'excitation tétanique (phase initiale de l'HPT) qu'au repos. Dans ces conditions, l'HPT peut facilement atteindre des niveaux supérieurs à ceux que l'on peut prévoir de la réduction de $[K]_e$ sur une préparation au repos. Nous admettons ainsi que la phase initiale ample et rapide de l'HPT peut être en partie expliquée par une élévation momentanée de P_K se superposant à la variation de $[K]_e$ créé par l'activation de la pompe. Nous avons envisagé aussi que la chute rapide de la phase initiale puisse être expliquée par une auto-inhibition de la pompe résultant d'un abaissement rapide et prononcé de la concentration en potassium sur

la face externe de la membrane nodale à la fin du tétanos. Cette proposition à l'avantage d'expliquer l'existence d'un niveau de saturation de l'HPT que l'on peut considérer comme la capacité de transport maximum de la pompe dans des conditions expérimentales données.

Une implication intéressante est que la pompe Na-K de la fibre myélinisée maintient constantes non seulement les concentrations ioniques intra-cellulaires mais aussi celles de l'espace périnodal. On conçoit d'ailleurs facilement que cette double fonction soit nécessaire si l'on considère que les axones dans un tronc nerveux, sont isolés du milieu circulant par deux barrières de diffusion : le périnèvre d'une part, l'endonèvre et les restrictions de l'espace inter-cellulaire d'autre part.

Une autre conséquence de l'activation de la pompe au cours d'une excitation tétanique des axones myélinisés est que l'hyperpolarisation progressive de leur membrane doit finalement entraîner, à plus ou moins long terme selon les conditions de stimulation , un arrêt de la décharge.

L'expérience montre qu'il en est effectivement ainsi et la figure 53 en apporte la démonstration. Dans cette expérience, le faisceau a été stimulé une première fois (en A) à une fréquence de 150 Hz par des impulsions de courant dépolarisant d'intensité suffisante pour évoquer des réponses d'amplitude maximale. A la fin de cette période d'excitation apparaît l'hyperpolarisation post-tétanique. Dans un deuxième temps (B), l'intensité des impulsions dépolarisantes a été réduite à une valeur légèrement inférieure à l'intensité maximale (on peut noter que la dépolarisation tétanique maximum est inférieure en B à ce qu'elle est en A). Dans ces conditions on observera que le seuil d'excitation reste à peu près constant pendant une quinzaine de secondes (la réponse se maintient à son niveau initial) puis brusquement, un grand nombre de fibres cessent de répondre (d'où une chute de la dépolarisation tétanique), très probablement en raison du développement de l'hyperpolarisation après une accumulation suffisante de sodium dans le compartiment intra-cellulaire.



- Figure 53 -

Dépolarisations tétaniques obtenues à une fréquence de stimulation de 150 Hz.
En A, pendant 15 secondes, l'intensité du courant de stimulation étant ajustée de façon à obtenir des potentiels d'action d'amplitude maximum.
En B, avec des courants d'intensité volontairement réduite de façon à obtenir des potentiels d'action d'amplitude inférieure à l'amplitude maximum.
Noter qu'en B, un grand nombre de fibres cessent de répondre après une quinzaine de secondes (chute marquée de la dépolarisation tétanique). On observe cependant des reprises périodiques d'activité.

L'arrêt de ces réponses doit entraîner un ralentissement de l'activité de la pompe et donc, un retour vers la polarisation normale; il s'en suit une reprise momentanée de l'activité suivie d'une nouvelle inhibition et ainsi de suite. Les intervalles de temps pendant les quels l'activite est réduite sont de l'ordre de la dizaine de secondes ce qui est en bon accord avec la constante de temps des hyperpolarisations post-tétaniques. Compte-tenu de la durée de ces intervalles et du temps pendant lequel des réponses normales peuvent être obtenues au début de l'excitation tétanique, il est difficile d'admettre qu'un accroissement cumulatif de P_K ou de l'inactivation de la perméabilité au sodium puisse rendre compte de ces inhibitions transitoires de la réponse rythmique (les constantes de temps des variations de perméabilité de la membrane passive sont beaucoup plus petites). Nous tenons donc pour très probable que les hyperpolarisations résultant de l'activité de la pompe Na-K de la fibre myélinisée puissent moduler son excitabilité au cours des décharges rythmiques. Ceci nous conduit naturellement à supposer que le phénomène "d'adaptation" puisse résulter, en grande partie de la stimulation du système transporteur actif de sodium et potassium

ADELMAN,W.J. et SENFT,J.P. - In the voltage clamped squid axon internal sodium inhibits potassium ion membrane currents.
1971, Fed. Proc., t. 30, p. 665.

AHMED,K. et JUDAH, J.D. - On the action of strophanthin G.
1965, Can. J; Biochem., t. 43, p. 877.

ARMETT,C.J. et RITCHIE, J.M. - On the permeability of mammalian non-myelinated fibres to sodium and to lithium ions.
1963, J. of Physiol., t. 165, p. 130.

BAKER, P.F. et MANIL, J. - The rates of action of K^+ and ouabain on the sodium pump in squid axons.
1968, [illegible]

BAKER, P.F., BLAUSTEIN, M.P., KEYNES, R.D., MANIL, J., SHAW, T.J. et STEINHARDT, R.A.— The ouabain sensitive fluxes of sodium and potassium in squid giant axons.
1969, J. of Physiol. t.200, p.459.

BAKER, P.F. et WILLIS, J.S. - On the number of sodium pumping sites in cell membrane.
1969, BBA, t. 183, p. 646.

BEAUGE, L.A. et ORTIZ,O. - Lithium stimulated sodium efflux in frog skeletal muscle.
1970, BBA, t. 219, p. 479.

BERGMAN, C. - Seuil d'excitation et régimes d'activité du noeud de Ranvier.
1969, Thèse Sciences.

BERGMAN, C. - Increase of sodium concentration near the inner surface of the nodal membrane.
1970, Pflüg. Arch., t. 317, p. 267.

BERGMAN, J. - Caractères de l'hyperpolarisation post-tétanique d'un faisceau de fibres nerveuses myélinisées.
1971, C.R.Soc.Biol., t. 164, p. 1254.

BERGMAN, J. - Contribution à l'étude de l'hyperpolarisation post-tétanique d'un faisceau de fibres nerveuses de Grenouille.
1972, C.R.Acad.Sci., t. 274, p. 1172.

BEZANILLA, F. et ARMSTRONG, C.M. - Negative conductance caused by entry of sodium and caesium ions into the potassium channels of the squid axons.
1972, J.Gen.Physiol., t. 60, p. 588.

BOYLE, P.J. et CONWAY, E.J. - Potassium accumulation in muscle and associated changes.
1941, J. of Physiol., t. 100, p. 1.

CALDWELL, P.C. - The effect of certain metabolic inhibitors on the phosphate esters of the squid giant axon.
1956, J. of Physiol., t. 132, p. 352.

CALDWELL, P.C. et KEYNES, R.D. - The utilisation of phosphate bond energy for sodium extrusion from giant axons.
[illegible]

CALDWELL, P.C. et KEYNES, R.D. - The effect of ouabain on the efflux of sodium from a squid giant axon.
[illegible]

CALDWELL, P.C., HODGKIN, A.L., KEYNES, R.D. et SHAW, T.I. - The effects of injecting "energy-rich" phosphate compounds on the active transport of ions in the giant axons of Loligo.
1960, J. of Physiol., t. 152, p. 561.

CALDWELL, P.C. - Factors governing movement and distribution of inorganic ions in nerve and muscle.
1966, Physiol. Rev., t. 46, p. 1.

CARPENTER, D.O - Membrane potential produced directly by the Na^+ pump in Aplysia neurons.
1970, Comp. Bioch. Physiol., t. 35, p. 371.

CERF, J. - Relation entre l'effet dépolarisant du lithium et son action dépressive dsur le nerf de Grenouille.
1955, Arch. Int. Pharmacodyn., t. 103, p. 281.

CHANDLER, W.K., HODGKIN, A.L. et MEVES, H. - The effect of changing the internal solution and related phenomena in giant axons.
1965, J. of Physiol., t. 180, p. 821.

CHARNOCK, J.S., DOTY, D.M. et RUSSELL, J.C. - The effect of temperature on the activity of (Na^+-K^+) ATPase.
1971, Arch. Bioch. Bioph., t. 142, Nb. 2.

CONNELLY, C.M. - Recovery process and metabolism of nerve.
1959, Rev. Mod. Physics, t. 31

CROSS, S.B., KEYNES, R.D. et RYBOVA, R. - The coupling of sodium efflux and potassium influx in fog muscle.
1965, J; of Physiol., t. 181, p. 865.

DODGE, F.A. et FRANKENHAEUSER, B. - Membrane currents in isolated nerve fibres under voltage clamp conditions.
1958, J. of Physiol., t. 143, p. 76.

DUNHAM, E.T. - Linkage of active cation transport to ATP utilization.
1957, Physiologist, t. 1, p. 23.

ERLANGER, J. et GASSER, H.S. - Electrical signs of nervous activity.
1937, University of Pennsylvania Press, p. 1.

EVANS, D.M. et MURRAY, J.G. - Histological and functional studies on the fibre composition of the vagus nerve of the rabbit.
1954, J. Anat. Lond., t. 88, p. 320.

FLICK, H. - Die Wirkung erhöhter Natrium-auBenkonzentrationen auf das Ruhe und Aktionspotential markhaltigen Nervenfasern.
1965, Pflüg. Arch., t. 284, p. 201.

FRANKENHAEUSER, B. - Steady state inactivation of sodium permeability in myelinated nerve fibres of Xenopus laevis.
[illegible], t. [illegible], p. [illegible].

FRANKENHAEUSER, B. - Potassium permeability in myelinated nerve fibres of Xenopus laevis.
1962, J. of Physiol., t. 160, p. 54.

FRANKENHAEUSER, B. et MOORE, L.E. - The effect of temperature on the sodium and potassium permeability changes in myelinated nerve fibres of Xenopus laevis.
1963, J. of Physiol., t. 169, p. 431.

FRANKENHAEUSER, B., et VALLBO, A.B. - Accomodation in myelinated nerve fibres of Xenopus laevis as computed on the basis of voltage clamp data.
1965, Acta Physiol. Scand., t. 63, p. 1.

GAGE, P.W. et HUBBARD, J.I. - Ionic changes resposible for post-tetanic hyperpolarization.
1964, Nature, t. 203, p. 653.

GARRAHAN, P.J. et GLYNN, I.M. - The sensitivity of the sodium pump to external sodium.
1967, J. of Physiol., t. 192, p. 175.

GERARD, R.W. - The response of nerve to oxygen lack.
1932, Amer. J. Physiol., t. 92, p. 498.

GLYNN, I.M. - Sodium and potassium movements in human red cells.
1956, J. of Physiol., t. 134, p. 278.

GLYNN, I.M. - The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells.
1957, J. of Physiol., t. 136, p. 148.

GLYNN, I.M. - An adenosine triphosphatse from electric organ activated by sodium and potassium and inhibited by ouabain or oligomycin.
1962, Biochem. J., t. 84, p. 75P.

CLYNE, T.K. - Activation of adenosine triphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal [illegible]
1962, J. of Physiol., t. 160, p. 18P.

GUSTAFSON, B., LINDSTROM, S. et TAKATA, N. - Re-evaluation of the after hyperpolarization mechanism in dorsal spinocerebellar tract neurons.
1971, Brain Res., t. 35, p. 543.

HARRIS, E.J. et MAIZELS, M. - The permeability of human erythrocytes to sodium.
1951, J. of Physiol., t. 113, p. 506.

Den HERTOG, A., GREENGARD, P. et RITCHIE, J.M. - On the metabolic basis of nervous activity.
[illegible]

Den HERTOG, A. et RITCHIE, J.M. - A comparison of the effect of temperature, metabolic inhibitors and ouabain on the electrogenic component of the sodium pump in mammalian non-myelinated nerve fibres.
[illegible]

Den HERTOG, A. et RITCHIE, J.M. - The effect of some quaternary compounds and local anaesthetics on the electrogenic component of the sodium pump in mammalian non-myelinated nerve fibres.
1969, Eur. J. Pharmacol., t. 6, p. 138.

HILLE, B. - The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion.
1967, J. Gen. Physiol., t. 50, p. 1287.

HILLE, B. - Pharmacological modification of the sodium channels of frog nerve.
[illegible]

HILLE, B. - Charges and potentials at the nerve surface.
[illegible]

HILLE, B. - The permeability of the sodium channel to metal cations in myelinated nerve.
1972, J. Gen. Physiol., t. 59, p. 637.

HODGKIN, A.L. et KATZ, B. - The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid.
1949, J. of Physiol., t. 108, p. 37.

HODGKIN, A.L. - The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle.
1951, Biol. Rev., t. 26, p. 339.

HODGKIN, A.L. et HUXLEY, A.F. - A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.
1952, J. of Physiol., t. 117, p. 500.

HODGKIN, A.L. et KEYNES, R.D. - Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo.
1955, J. of Physiol., t. 128, p. 28

HODGKIN, A.L. et KEYNES, R.D. - Experiments on the injection of substances into squid giant axons by means of a microsyringe.
1956, J. of Physiol., t. 131, p. 592.

HOFFMAN, J.F. - Differential effects of cardiac glycosides and on Na exchange diffusion and active transport in red cells.
1964, Fed. Proc., t. 23, p. 918.

HOLMES, O. - Effect of pH changes of potassium concentration and metabolic inhibitor on the after potentials of mammalian non myelinated nerve fibres.
1968, Acta. Int. Physiol., t. 70, p. 211.

HOROWICZ, P. et GERBER, C.J. - Effects of external potassium and strophanthidin on sodium fluxes in frog striated muscle.
1965, J. Gen. Physiol., t. 48, p. 514.

HURLBUT, W.P. - Sodium fluxes in desheathed frog sciatic nerve
1963, J. Gen. Physiol., t. 46, p. 1191.

HURLBUT, W.P. - Potassium fluxes in desheathed frog sciatic nerve.
1963, J. Gen. Physiol., t. 46, p. 1223.

HUXLEY, A.F. et STAMPFLI, R. - Effect of potassium and sodium on resting and action potentials of simple myelinated nerve fibres.
1951, J. of Physiol., t. 113, p. 496.

KEHOE, J. et ASCHER, P. - Re-evaluation of the synaptic activation of an electrogenic sodium pump.
1970, Nature, t. 225, p. 820.

KERKUT, G.A. et THOMAS, R.C. - An electrogenic sodium pump in snail nerve cells.
1965, Comp. Bioch. Physiol., t. 14, p. 167.

KEYNES, R.D. - The ionic fluxes in frog muscles.
1954, Proc.Roy. Soc.Biol., t. 142, p. 359.

KEYNES, R.D. et SWANN, R.C. - The permeability of frog muscle fibres to lithium ions.
1959, J. of Physiol., t. 147, p. 626.

KEYNES, R.D. et RITCHIE, J.M. - The movements of labelled ions mammalian non-myelinated nerve fibres.
1965, J. of Physiol., t. 179, p. 333.

KINSOLVING, C.R., POST, R.L. et BEAVER, D.L. - Sodium plus potassium transport adenosine triphosphatase activity in kidney.
1963, J. Cell Comp. Physiol., t. 62, p. 85.

KOPPENHOFER, E. - Die Wirkung von Tetraäthyl ammoniumchlorid auf die Membranströme Ranvierscher Schnürringe von Xenopus laevis.
1967, Pflug. Arch., t. 293, p. 34.

[illegible], R.D., KRNJEVIC, K. et [illegible] - Potential dependent membrane current during the active transport of ions in snail neurons.
1972, J. of Physiol., t. 226, p. 373.

KUNO, M., MIYAHARA, J.T. et WEAKLEY, J.N. - Post-tetanic hyperpolarization produced by an electrogenic pump in dorsal spinocerebellar tract neurones of the cat.
1970, J. of Physiol., t. 210, p. 839.

LANDOWNE, D. et RITCHIE, J.M. - Optical studies on the kinetics of the sodium pump in mammalian non-myelinated nerve fibres.
1971, J. of Physiol., t. 212, p. 483.

LORENTO de NO, R. - A study of nerve physiology.
1947, Studies from the Rockefeller Institute for Medical Research, t. 131-132, New York.

LUNDBERG, A. et OSCARSON, O. - Anoxic depolarization of mammalian nerve fibres.
1952, Acta Physiol. Scand., t. 30, Sup. 111, p. 99.

LUTTGAU, H.C. - Das Na Transportsystem während der Erregungsprozesse am Ranvierknoten isolierter markhaltiger Nervenfa[illegible].
1961, [illegible]. t. 12, p. 403.

LUTTGAU, H.C. - Das Kalium transportsystem am Ranvierknoten isolierter markhaltifer Nervenfasern.
1960, Pflug. Arch., t. 271, p. 613.

MENES, H. - Die Nach_potentiale isolierter markhaltiger Nervenfasern des Frosches bei tetanischer Reizung.
1961, Pflug. Arch., t. 272, p. 336.

MULLINS, L.J. et BRINLEY, F.J. - Potassium fluxes in dialysed squid axons.
1969, J. Gen. Physiol., t. 53, p. 704.

NAKAJIMA, S. et TAKAHASHI, K. - Post-tetanic hyperpolarization and electrogenic Na pump in stretch receptor neurone of crayfish.
1966, J. of Physiol., t. 187, p. 105.

NARAHASHI, T., MOORE, J.W. et SCOTT, W. - Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in excitation.
1964, J. Gen. Physiol., t. 47, p. 965.

OVERTON, E. - Beiträge zur allgemeinen Muskel und Nerven-physiologie.
1902, Pflug. Arch., t. 92, p. 346.

PINSKER, H. et KANDEL, E.R. - Synaptic activation of an electrogenic sodium pump.
1966, Science, t. 163, p. 931.

potassium
POST, R.L. et JOLLY, P.C. - The linkage of sodium and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane.
1957, BBA, t. 25, p. 118.

POST, R.L., SEN, A.K. et ROSENTHAL, A.S. - A phosphorylated intermediate in adenosine triphosphate dependent sodium and potassium transport across kidney membrane.
1965, J. Biol. Chem., t. 240, p. 1437.

RANG, H.P. et RITCHIE, J.M. - On the electrogenic sodium pump in mammalian non-myelinated nerve fibres and its activation by various external cations.
1968, J. of Physiol., t. 196, p. 183.

REHM, W.S. - A theory of the formation of HCl by the stomach.
1950, Gastroenterology, t. 14, p. 401.

RITCHIE, J.M. et STRAUB, R.W. - The hyperpolarization which follows activity in mammalian non medullated fibres.
1957, J. of Physiol., t. 136, p. 80.

RITCHIE, J.M. - Electrogenic pumping in nervous tissue.
1971, Current Topics in Bioenergetics, t. 4, p. 327.

RUD, J. - Local anaethetics. An electrophysiological investigation of local anaethesia of peripheral nerves, with special reference to xylocaine.
1961, Acta Physiol. Scand., t. 51, Sup. 178.

SACHS, J.R. - Competitive effect of [illegible] cations on active potassium transport in the human red blood cell.
1967, J. Clin. Invest., t. 46, p. 1433.

SACHS, J.R. et CONRAD, M. - Effect of tetraethylammonium on the active cation transport system of the red blood cell.
1968, Amer.J. Physiol., t. 215, p. 795

SCHATZMANN, H.J. - Herzglykosides als Hemmstoffe fur den aktiven Kalium und Natriumtransport durch die Erythrocyten membran.
1953, Helv. Physiol. Acta, t. 11, p. 346.

SCHMIDT, H. - Eine methode zur Messung von Anderungen des Membran Widerstandes an Bundeln markhaltiger Nervenfasern.
1961, Pflug. Arch., t. 274, p. 26.

SCHMIDT, H. - Messung von Anderungen des Membranwiderstandes markhaltiger Nervenfasern mit der Saccharose Trennwand Methode.
[illegible]

SCHMIDT, H. - Die Abhängigkeit des Ruhe potentials markhaltiger Nervenfasern vom Elektrolytgehalt der Außen_flüssigkeit.
1964, Ann.Univ. Saravensis, t. 11,

SCHMIDT, H. et STAMPFLI, R. - Die Wirkung von tetraäthylammonium chlorid auf den einzelnen Ranvierschen Schnürringen.
[illegible]

SCHWARZ, J.R. et VOGEL, W. - Potassium inactivation in single myelinated nerve fibres of Xenopus laevis.
[illegible]

SEN, A.K. et POST, R.L. - Stoechiometry of active Na^+ and K^+ transport to energy-rich phosphate breakdown in human erythrocytes.
1964, Fed. Proc., t. 23, p. 138.

SEN, A.K. et POST, R.L. - Stoechiometry and localization of adenosine triphosphatase dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte.
1964, J. Biol. Chem., t. 239, p. 345.

SHAW, T.I. - Sodium and potassium movements in red cells.
1954, Cambridge University PhD. Thesis.

SJODIN, R.A. et BEAUGE, L.A. - The ion selectivity and concentration dependence of cation coupled active sodium transport in squid giant axon.
1967, Curr. Mod. Biol., t. 1, p. 105.

SKOU, J.C. - The influence of some cations on the adenosine triphosphatase from peripheral nerves.
1957, BBA, t. 23, p. 394.

SKOU, J.C. - Further investigations on a $Mg^{++} - Na^+$ activated adenosine triphosphatase possible related to the active linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane.
1960, BBA, t. 42, p. 6.

SKOU, J.C. - Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na^+ and K^+.
1962, BBA, t. 58, p. 314.

SKOU, J.C. - Enzymatic aspects of active linked transport of Na^+ and K^+ through the cell membrane.
1964, Progress in Biophys., t. 14, p.

STEINBACH, H.B. - Electrolyte balance of animal cells.
1940, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., t. 8, p. 242.

STONE, A.J. - A proposed model for the Na^+ pump.
1968, BBA, t. 150, p. 578.

STAMPFLI, R. - A new method for measuring membrane potentials with external electrodes.
1954, Experientia, t. 10, p. 509.

STRAUB, R.W. - On the mechanism of post-tetanic hyperpolarization in myelinated nerve fibres from the frog.
1961, J. of Physiol., t. 159, p. 19P.

THOMAS, R.C. - Membrane current and intracellular sodium changes in a snail neurone during extrusion of injected sodium.
1969, J. of Physiol., t. 211, p.

THOMAS, R.C. - Intracellular sodium activity and the sodium pump in snail neurones.
1972, J. of Physiol., t. 220, p. 55.

USSING, H.H. - Transport of ions across cellular membrane.
1949, Physiol. Rev., t. 29, p. 127.

VALLBO, A.B. - Accomodation related to inactivation of the sodium permeability in single myelinated nerve fibres from Xenopus laevis.
1964, Acta Physiol. Scand., t. 61, p. 429.

VIERHAUS, J. et ULBRICHT, W. - The rate of action of tetraethylammonium ions on the duration of action potentials in single Ranvier nodes.
1971, Pflug. Arch., t. 326, p. 88.

WESPI, H.H. - Active transport and passive fluxes of K, Na and Li in mammalian non-myelinated nerve fibres.
1969, Pflug. Arch., t. 306, p. 262.

WRIGHT, E.B. - The effects of asphyxiation and narcosis on peripheral nerve polarization and conduction.
1947, Amer. J. Physiol., t. 148, p. 174.